UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
Departamento de Neurologia
Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS

INTENSIFICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA DO CÂNCER PELA VARIAÇÃO DA PRESSÃO PARCIAL DO OXIGÊNIO NO TECIDO: *EFEITOS FÍSICOS E BIOLÓGICOS.*

Valdir Carlos Colussi

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola.
(Instituto de Física Gleb Wataghin)
Co-ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Ester Maria Danielli Nicola.
(Faculdade de Ciências Médicas)

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM NEUROCIÊNCIAS.

Trabalho parcialmente financiado pela FAPESP, CNPq e UNICAMP.

CAMPINAS - SP
1997

UNIDADE BC
N.º CHAMADA: T/UNICAMP C723i
V. Ex.
TOMBO BC/ 30938
PROC. 281/97
C [ ] D [x]
PREÇO R$ 11,00
DATA 02/07/97
N.º CPD

CM-00098915-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

Colussi, Valdir Carlos

C723i Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: Efeitos fisicos e biológicos / Valdir Carlos Colussi. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientadores : Jorge Humberto Nicola, Ester Maria Danielli Nicola

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hematoporfirina. 2. Fotossensibilização biológica. 3. Câncer. 4. Oxigenação Hiperbárica. I. Jorge Humberto Nicola. II. Ester M. Danielli Nicola. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola.
Co-ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Ester Maria Danielli Nicola.

MEMBROS:

1. Prof. Dr. Jorge H. Nicola (UNICAMP - Campinas).
2. Prof. Dr. Jarbas C. de Castro (USP - SP).
3. Profa. Dra. Denize M. Zezell (IPEN - SP).
4. Prof. Dr. Cylon E. T. G. da Silva (UNICAMP - Campinas).
5. Prof. Dr. Konradin Metze (UNICAMP - Campinas).

Curso de Pós-Graduação em Neurociências
Universidade Estadual de Campinas

DATA: 08 de Abril de 1997.

"O trabalho supremo do físico é o descobrimento das leis elementares mais gerais, e a partir das quais pode ser deduzida logicamente a imagem do mundo. Todavia, não existe um caminho lógico para o descobrimento destas leis elementares. Existe unicamente o caminho da intuição, ajudado por um sentido rumo à ordem que há por detrás das aparências".

Albert Einstein

À minha principal colaboradora,
Larissa W. S. Colussi
e aos mais importantes
frutos desta colaboração:

Lara
e
Núbia

AGRADECIMENTOS

Quando começo a pensar nos difíceis estágios por que passou este projeto, não posso deixar de lembrar a importante demonstração de amizade que recebi de várias pessoas, sem as quais, não seria possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Valdir e Mercedes, gratidão eterna pelo amor, oportunidades e apoio durante toda a minha vida. Ao meu irmão, Duto, 'companheiro de viajem', agradeço pela consideração amor e carinho durante todos estes anos. A minha esposa Larissa e filhas, Lara e Núbia, pelo amor e incentivo criado por um ambiente de compreensão, onde pude muitas vezes "mergulhar" em meu ideal científico, a elas agradeço e lamento ao período crítico que pa$$amo$. Agradeço a Tereza Lúcia (Tutinha) pela mão amiga, experiente e realista, com relação aos problemas inerentes a nossa profissão e objetiva quanto se tratou da resolução de alguns deles. Agradeço também a toda família Sápia pelo apoio, carinho e momentos de lazer.

Ao Prof. Jorge Nicola pela amizade, paciência, apoio, ter propiciado uma orientação voltada para um futura autonomia científica, e por ter assegurado a retaguarda nas partes relacionadas a física. A Profa. Ester Nicola pela amizade, apoio, carinho, orientação e suporte nas partes relacionadas a medicina. Ao casal, pela manutenção da retaguarda acadêmica, a oportunidade, e a confiança depositada, refletida no uso de seus laboratórios com plena liberdade.

Ao pessoal do Escritório de transferência de tecnologia (ETT), Ricardo, Rejane, Davi, Eliete, Marta, Andréia, principalmente pelo carinho, amizade, tolerância e apoio constante que vocês tem dado desde o início deste trabalho.

Ao pessoal do Núcleo de medicina experimental pela amizade, em especial a Ana, Maria D. Oliveira; minha companheira de trabalho - sempre tornando a rotina do laboratório mais fácil, ao Willian; a quem devo todas as técnicas e algumas boas idéias com relação à manipulação com animais experimentais, a Rosana; por todas as "dicas" e indicações dos colaboradores que 'abençoaram interdisciplinarmente' este projeto. Ao Adilton pelos infindáveis empréstimos da balança. A Bete por emprestar o espectrômetro no início, proporcionado os primeiros 'gols' do projeto.

Ao pessoal da Unidade laser do HC, Gema, Wagner, Ivanilde, e especialmente a Diva Baldin pela amizade e carinho com que me recebeu no início de nossa pós-graduação e agradeço inclusive por ter trazido o HpE da Europa, sem a qual dificilmente este trabalho seria concluído.

Ao Dr. Ovídio Rettori e Dra. Ana Neuza pelo apoio, carinho que demonstraram ao me receber em seu laboratório e colaboração, fornecendo gentilmente a linha tumoral Walker 256, me ensinando toda a técnica de manutenção e inoculação, inclusive me fornecendo a técnica de sincronização de efeitos sistêmicos que utilizamos neste trabalho. A Dra. Tereza Cavalcante pela permissão da realização de vários experimentos feitos em seu laboratório e ao Fernando pela amizade e apoio técnico.

Ao Prof. Konradin Metze pela amizade, apoio, colaboração e profissionalismo com que analisou as lâminas histológicas, oferecendo um "feedback" experimental que assegurava que o nosso trabalho estava caminhando na direção correta. Agradeço também por ter me guiado em várias metodologias biológicas que eu não estava familiarizado devido minha formação na área exata de física experimental básica.

Ao pessoal da Neurociências, Profa. Valeriana, Prof. Jayme, a Solange, e em especial a Ana Adélia pela destreza, atenção e carinho que tem tratado e resolvido minhas "atrapalhadas" de ordem acadêmicas.

Ao pessoal do Instituto de física, Prof. Fernando pelo empréstimo do laser de argônio que foi utilizado no ensaio experimental da pré-ativação da Merocianina 540, Profa. Maria José pelo empréstimo do *Lock-in* nos ensaios experimentais da emissão por dupla excitação *in vivo*. Ao pessoal da biblioteca. Ao pessoal do GDAL, em especial ao Milton Tanabe que tem colaborado tecnicamente em tudo o que foi preciso nos experimentos realizados. Ao Nelson, que construiu a câmara hiperbárica sem um projeto propriamente dito e com um resultado final excelente. Agradeço também ao Nilson e Elidiane pela ajuda nos experimentos iniciais de aquisição de dados e espectroscopia.

Ao Dr. Paulo Iazetti por ter colaborado nas discussões sobre o ambiente hiperbárico e esclarecimentos sobre a construção da câmara.

Ao Tadeu (da A.S) pelo profissionalismo, e por ter proporcionado condições de compra do HpE, outros fotossensibilizadores, como a Merocianina 540 e o Ácido aminolevulínioco (ALA).

A Profa. Christine Hackel pelo carinho que me recebeu em seu laboratório e colaboração, e a Daniela pelo suporte na utilização da técnica de extração do material genético do mesmo corte histológico, facilitando em muito a análise dos resultados pela comprovação do padrão de morte celular característica, obtida neste trabalho.

Ao pessoal da FCM, principalmente a Sandra e a Mônica por ter me ajudado na compra dos materiais e nas prestações das contas, e a utilização do "scanner". Ao pessoal do Audio-Visual em especial ao Bá pela sensibilidade e profissionalismo com que tem tratado o nosso material de divulgação científica e em particular a editoração da versão final da tese. Agradeço também ao Mário (anteriormente) e atualmente ao César pela técnica e profissionalismo que trataram a documentação fotográfica de nossos experimentos.

Finalmente gostaria de agradecer a todas as pessoas que me deram a oportunidade de desenvolver este trabalho. Para estes, digo com orgulho que acredito que 'a missão' foi cumprida com grande êxito. Não gostaria de esquecer dos "avarentos acadêmicos", que foram raros, mas não me deram o mesmo prazer, pois afinal de contas, foi graças a estas pessoas que pude encontrar colaboradores tão interessantes que possibilitaram o desenvolvimento de um trabalho interdisciplinar produtivo e a uma interação *rara* em centros de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO. ____ 01.
ABSTRACT. ____ 02.
LISTA DAS FIGURAS. ____ 03.
LISTA DAS TABELAS. ____ 04.

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 01: INTRODUÇÃO ____ 05.
1. Motivação. ____ 12.
2. Objetivos. ____ 12.

CAPÍTULO 02: CÂNCER COMO UMA DOENÇA
1. Introdução. ____ 13.
2. Tipos de câncer. ____ 14.
3. Aspectos gerais sobre a biologia do câncer. ____ 15.
3.1. Ciclo celular. ____ 15.
4. Aspectos básicos sobre injúria e morte celular. ____ 17.
4.1. Mecanismo da apoptose. ____ 19.
5. Caminhos da PDT para destruição tumoral. ____ 21.
5.1. Destruição indireta de células tumorais. ____ 21.
5.2. Efeito fotossensibilizante direto em células neoplasicas. ____ 22.

CAPÍTULO 03: LUZ E TECIDO BIOLÓGICO
1. Introdução. ____ 23.
2. Luz e laser. ____ 23.
3. Modelo ondulatório da luz no tecido biológico. ____ 24.
4. Propagação da luz na matéria. ____ 26.
4.1. Irradiância. ____ 28.
5. Janela biológica. ____ 29.
6. Janela terapêutica. ____ 29.
7. Modelo corpuscular da luz no processo fotodinâmico. ____ 30.
7.1. Postulados da mecânica quântica de interesse ao nosso estudo. ____ 31.
7.2. Transições quânticas. ____ 33.
7.3. Regras de seleção para uma transição de dipolo elétrico. ____ 35.
8. Moléculas diatômicas. ____ 36.
8.1. Configuração eletrônica do oxigênio. ____ 38.
9. Aspectos gerais do oxigênio no tecido. ____ 40.
9.1. Tecido normal. ____ 41.
9.2. Tecido tumoral. ____ 41.
10. Aspectos gerais sobre pressões parciais de oxigênio. ____ 43.
10.1. Hiperoxigenação. ____ 43.
10.2. Ambiente hiperbárico. ____ 43.
11. Fotossensibilizadores. ____ 44.
11.1. Transporte e localização do HpD *in vivo*. ____ 45.

CAPÍTULO 04: TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA À HIPEROXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA
1. Introdução. ____ 47.
2. Derivados de hematoporfirina (HpD). ____ 48.
3. Mecanismos moleculares de fotossensibilização. ____ 49.
3.1. Processos fotofísicos primários em um fotossensibilizador orgânico. ____ 49.
3.1.1. Fotooxidação por radicais *(Reação tipo I)*. ____ 50.
3.1.2. Fotooxidação pelo oxigênio singlete *(Reação tipo II)*. ____ 51.
3.1.3. Reações que não envolvem oxigênio *(Reação tipo III)*. ____ 52.
4. Terapia fotodinâmica do câncer propriamente dita. ____ 52.
4.1. Modelo matemático. ____ 54.
4.1.1. Fonte de luz. ____ 54.
4.1.2. Fotossensibilizador. ____ 54.
4.1.3. Oxigênio. ____ 55.
4.1.4. Dano fotodinâmico. ____ 56.
5. Débito e suprimento de O_2 na terapia fotodinâmica. ____ 57.

MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO 05: MATERIAIS E MÉTODOS
1. Materiais. ____ 59.
1.1. Fotossensibilizador. ____ 59.
1.2. Fonte de luz. ____ 59.
1.3. Registro fotográfico. ____ 59.
1.4. Animais de experimentação. ____ 60.
1.4.1. Ratos como animais na oncologia. ____ 60.
1.5. Tumor de Walker 256. ____ 61.
1.5.1. Manutenção da linha tumoral. ____ 61.
1.5.2. Obtenção de modelos tumorais sólidos. ____ 62.
1.5.3. Padronização dos efeitos sistêmicos. ____ 62.
1.6. Câmara hiperbárica. ____ 63.
1.7. Fluorescência. ____ 65.
2. Métodos. ____ 66.
2.1. Padronização da evolução tumoral do Walker 256. ____ 66.
2.2. Terapia Fotodinâmica em hiperoxigenação hiperbárica. ____ 67.
2.3. Histologia. ____ 69.
2.4. Extração de DNA e eletroforese em gel de agarose. ____ 69.

RESULTADOS, TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS E DISCUSSÕES

CAPÍTULO 06: RESULTADOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO
1.1. Diagnóstico da fluorescência. ____ 71.
1.2. Distribuição fluorescente no tecido normal e tumoral. ____ 73.
2. Tratamento via terapia fotodinâmica em condições hiperbáricas. ____ 76.
2.1. Análise histológica. ____ 76.
2.2. Extração de DNA e eletroforese em gel de agarose. ____ 79.

3. Tratamento estatístico. ____ **81.**
3.1. Introdução. ____ **81.**
3.2. Parametrização. ____ **81.**
3.3. Resultados quantitativos. ____ **82.**
3.4. Estatística descritiva. ____ **82.**
3.5. Comparação de 2 grupos. ____ **83.**
3.6. Descrição gráfica. ____ **84.**
3.7. Análise discriminante. ____ **84.**

CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS

CAPÍTULO 07: CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS ____ **86.**

APÊNDICES

APÊNDICE A: CRITÉRIO DE DESCOBERTA DE NOVAS DROGAS ____ **89.**

APÊNDICE B: COMPOSIÇÃO DO HpE ____ **90.**
1. Dados cromatográficos. ____ **90.**
2. Espectro de absorção. ____ **90.**
3. Espectro de emissão fluorescente. ____ **90.**
4. Técnica de preparação de um HpD. ____ **91.**

APÊNDICE C: LASER DE HeHe ____ **92.**
1. Transições de dipolo elétrico. ____ **93.**
2. Mecanismo de bombeamento do laser de HeNe. ____ **95.**

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ____ **96.**

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica do Câncer (PDT) é baseada no envolvimento de três fatores, a saber: retenção pelo tecido canceroso de um fotossensibilizador específico; iluminação localizada da lesão e ocorrência de oxigênio inicialmente no estado fundamental triplete. Na literatura científica sobre o assunto, encontram-se vários trabalhos sobre a dosagem de fotossensibilizadores diversos e sobre a dosimetria da radiação visível capaz de provocar a terapia. O nível de oxigênio, por depender intrinsecamente do organismo tratado, tem sido tomado como um parâmetro constante na terapia e raramente estudado. No presente trabalho apresentamos pela primeira vez um desenvolvimento teórico que relaciona matematicamente o dano celular resultante do tratamento, com a variação do aporte de oxigênio nas células cancerosas. Para testar a teoria desenvolvida, levamos a cabo uma série de experimentos de PDT com o tumor de Walker 256 em ratos, em situações de hiperoxigenação hiperbárica (HBO), em câmara experimental especialmente projetada e construída, comparadas com situações normobáricas. Os resultados foram conclusivos, mostrando que a previsão teórica está correta, sendo constatado um aumento na eficiência do tratamento em situação hiperbárica, relativo ao convencional, da ordem de 4:1 em densidade de células cancerosas eliminada.

ABSTRACT

Photodynamic therapy is based on simultaneous involvement of three factors, namely: *tumor tissue retention of an specific photosensitizer; local illumination of the lesion and occurrence of oxygen in the triplet state*. Theoretically, changes in any one of these factors may be compensated by a change in the other factors, leading to the same therapeutic result. Practically this is not true, but we expect to find an ideal combination of these three factors which may give the best clinical results. We present experimental results of PDT under Hyperbaric hyperoxia (HBO) in tumor masses at the dorsal subcutaneous tissue of rats. These tumors were created by previous inoculation of "Walker 256" neoplastic cells. Haematoporphyrin Esther (HpE) was administered as the photosensitizer. The rats were pressurized up to 3 atm, with 100% oxygen continuous ventilation condition in an specially designed hyperbaric chamber. In animals treated with PDT/HBO the histology revealed a very important reduction in the number of the tumor cells as compared with PDT controls in normal atmospheric condition, showing numerous apoptotic as well as necrotic cells at the border of the irradiated area. The observed enhancement in the PDT for this situation is, of course, related to extra oxygen in the circulatory system.

LISTA DAS FIGURAS

Figura 2.1: Ciclo celular esquemático do tumor de um mamífero.
Figura 2.2: Diagrama ilustrativo das características morfológicas da apoptose.
Figura 2.3: Diagrama proposto para o caminho da destruição tumoral.

Figura 3.1: Configuração básica de uma onda eletromagnética plana "congelada" no espaço e no tempo.
Figura 3.2: Diagrama esquemático do espectro eletromagnético.
Figura 3.3: Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração de diferentes comprimentos de onda.
Figura 3.4: Representação esquemática do processo de transição entre 2 níveis de um sistema na presença de um campo eletromagnético externo.
Figura 3.5: Orbitas atômicas e moleculares dos elementos N, N_2, O, O_2.
Figura 3.6: Ilustração esquemática de dois possíveis modelos para o desenvolvimento de hipóxia em tumores.
Figura 3.7: Transporte e localização dos fotossensibilizadores, e supostos alvos fotodinâmicos de tumores *in vivo*.
Figura 3.8: Esquema da uma membrana mostrando as moléculas de porfirina difundindo na bicamada lipídica de acordo com seu estado de protonação.

Figura 4.1: Espectro de absorção, e emissão fluorescente para excitação com $\lambda \cong 400\eta m$ de um HpD.
Figura 4.2: Diagrama de Jablonski. Esquema simplificado do processo de fotossensibilização mediado por um fotossensibilizador envolvendo conversão de fotoenergia para espécies quimicamente ativadas.
Figura 4.3: Um esquema simplificado dos níveis eletrônicos do fotossensibilizador e do oxigênio.
Figura 4.4: Esquema mostrando os níveis eletrônicos do fotossensibilizador e as várias transições possíveis, e respectivas taxas de transição.
Figura 4.5: Esquema simplificado dos níveis eletrônicos do oxigênio.
Figura 4.6: Esquema simplificado dos níveis eletrônicos da molécula de oxigênio presente no meio biológico.
Figura 4.7: Esquema geral do processo de fotossensibilização por um fotossensibilizador associado à Hiperoxigenação hiperbárica.

Figura 5.1: Projeto da câmara hiperbárica experimental.
Figura 5.2: Visão panorâmica da câmara hiperbárica experimental.
Figura 5.3: Desenho esquemático da montagem experimental utilizada na análise da fluorescência.
Figura 5.4: Rato acometido com tumor, 7 dias após a inoculação subcutânea multifocal.
Figura 5.5: Representação esquemática do protocolo experimental utilizado.
Figura 5.6: Animal sendo submetido ao tratamento PDT+HBO.

Figura 6.1: Espectro de emissão da lâmpada UV.
Figura 6.2: Espectro de emissão fluorescente do HpE retido no tumor de Walker 256.
Figura 6.3: Distribuição fluorescente do HpE. Processo dinâmico.
Figura 6.4: Distribuição fluorescente do HpE. Processo estático.
Figura 6.5: Registro fotográfico da fluorescência: Nódulos linfáticos ilíacos e corte sagital do tumor subcutâneo..
Figura 6.6: Corte histológico vertical do tumor.
Figura 6.7: Exame histológico do Walker 256 submetido a PDT+HBO.
Figura 6.8: Eletroforese do DNA de algumas regiões específicas do tumor tratado.
Figura 6.9: Esquema simplificado da região tratada do tumor.
Figura 6.10: Análise da distribuição de variáveis: Altura do tronco de cone tratado (h), Base superior (B).
Figura 6.11: Análise da distribuição de variáveis: Densidade de células viáveis após tratamento PDT, e valor efetivo do volume da área tratada (V_{Tronco}).
Figura 6.12: Representação gráfica dos parâmetros que expressaram melhor a diferença entre os grupos G1 e G3.

Figura C.1: Representação esquemática do processo de transição de dipolo-elétrico entre 2 níveis de um átomo na presença de um campo eletromagnético externo.
Figura C.2: Representação esquemática do sistema básico de um laser a gás.
Figura C.3: Diagrama de níveis de energia para o laser de HeNe.

LISTAS DAS TABELAS

Tabela 2.1: Diferença estrutural de células cancerosas em relação a células normais.
Tabela 2.2: Diferença funcional entre células cancerosas e células normais.
Tabela 2.3: Principais diferenças envolvendo necrose e apoptose.

Tabela 6.1: Dados experimentais obtidos pela morfometria.
Tabela 6.2: Descrição dos dados obtidos.
Tabela 6.3: Resultado da análise estatística utilizando o teste "t de student".
Tabela 6.4: Síntese dos resultados obtidos.

LISTAS DOS QUADROS

Quadro 6.1: Síntese dos resultados obtidos considerando os cinco grupos experimentais.

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Fotossensibilização pode ser definida como um conjunto de processos que induz um *sistema* a torna-se sensível à luz. Um *Fotossensibilizador*, que é uma substância capaz de absorver fótons, quando integrado a um sistema irradiado (átomo ou molécula), produz efeitos específicos que não ocorrem na ausência da luz. A terapia fotodinâmica do câncer (**Photodynamic Therapy-PDT**) é caracterizada por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem após a administração de um fotossensibilizador, retido exclusivamente em células tumorais, seguido pela irradiação local de luz visível.

Fototerapia e Fotoquimioterapia são formas de tratamento, conhecidas desde a antiguidade. Tanto uma como a outra fundamentam-se na ação da luz, sobre componentes químicos do tecido biológico ou retidos neste. Nas últimas décadas, o estudo e uso destas terapias tomaram novo impulso, principalmente com a proposta de tratamento para vários tipos de câncer (tumores sólidos, Leucemias, e envelope celular viral). A *Fototerapia* tem suas raízes nos tempos pré-históricos. Muitas culturas se beneficiavam das propriedades da luz do Sol sobre o corpo humano (helioterapia). Hipócrates estudou helioterapia e introduziu-a como uma ciência empírica em seu sanatório na ilha de Kós. Gregos e Romanos praticavam banho de sol como um tratamento para doenças específicas (***Sieber 1993***). Na Europa, a Fototerapia foi introduzida no início do século 19 pelo médico Dinamarquês Niels Ryberg Finsen. Finsen demonstrou que a luz ultravioleta emitida pelo sol foi altamente eficaz no tratamento de *Lupus vulgaris*, uma doença endêmica de pele, frequentemente encontrada durante os meses de inverno entre pacientes tuberculosos escandinavos. Este trabalho lhe rendeu o Nobel de Medicina de 1903.

O sucesso no tratamento da tuberculose alcançado pela introdução de antibióticos, suplementação alimentar e prevenção na deficiência da vitamina D, contribuíram para o desuso da fototerapia como disciplina científica ***(Parrish 1982)***. A fotomedicina tornou-se preocupada com o estudo de efeitos nocivos de excessiva exposição à luz do sol enquanto que pesquisas sobre efeitos benéficos da radiação luminosa receberam pouca atenção pela óptica moderna. Relatos sem fundamento e charlatanismo, conduziram a medicina americana a distanciar-se de todas as formas de fototerapia. Um exemplo foi o atraso na aceitação da Fototerapia ultravioleta no tratamento de *Icterícia neonatal*.

Agentes químicos que atuam como fotossensibilizadores, são abundantes na natureza. Muitos medicamentos populares, derivados de plantas e utilizados para o tratamento de infecções superficiais são eficazes graças a uma atividade antifungo e bactericida de fotossensibilizadores presentes nos extratos destas plantas. Os egípcios tratavam *vitiligo* com fotoquimioterapia. Eles estavam bem conscientes que o tratamento tinha duas componentes essenciais, a componente da droga (sementes de uma planta, *Amni majus Linn*), e uma componente luminosa (luz do sol). Hoje, a aplicação de *psoralenos* (P) e luz Ultravioleta (UV) tipo A, para tratamento de afecções cutâneas, dão origem à terapia P-UV-A. As doenças em que se tem utilizado essa combinação luz-fármaco são o *vitiligo*, a *psoríase*, a *micose fungóide*, o *líquen plano*, as *dermatites atópicas*, e uma variedade de *linfômas de células T*, entre outras ***(Parrish 1982, Russo 1995)***.

Quando o processo fototerápico ocorre com o auxílio de um agente químico exógeno ao organismo em tratamento, o processo é denominado de *Fotoquimioterapia*. Este é um termo bastante abrangente que inclui processos complexos como o caso da PDT.

A primeira investigação em laboratório do efeito fotodinâmico foi feita por Oscar Raab ***(Raab 1900)***, quando observou a ação citotóxica da luz em *Paramecium* por eosina e acridina laranja sensibilizadas. A primeira tentativa de usar o efeito fotodinâmico no tratamento de tumores humanos foi realizada por Tappenier e Jesionek em 1903 ***(Tappenier 1903)*** quando comprovaram o efeito antitumoral da luz sobre o câncer de pele, após aplicação prévia de eosina.

Desde a descoberta de Raab, muitos pesquisadores tem mostrado interesse na fotooxidação, onde organismos morrem devido a ativação de corantes (por radiação de comprimento de onda definido) e oxigênio localizados nas células. Hausmann foi o primeiro a usar a hematoporfirina em estudos de ação fotodinâmica ***(Hausmann 1909)***, registrando a destruição de *Paramecia* e células vermelhas do sangue, descrevendo sintomas de sensibilidade em ratos quando expostos à luz. Em 1913, Meyer-Betz sensibilizou a si próprio e registrou sintomas semelhantes que duraram aproximadamente 2 meses ***(Meyer-Betz 1913)***.

Em 1924, **Policard** demonstrou a existência de fluorescência em certos tumores de animais, atribuindo-a ao acúmulo de porfirina endógena em tais tumores, devido a uma infecção secundária por bactérias hemolíticas ***(Policard 1924)***.

Em 1942, Auler e col. demonstraram que a hematoporfirina injetada sistematicamente em cobaias, tendia a acumular-se no tecido maligno existente e nos nódulos linfáticos ***(Auler 1942)***. Este grupo estava iniciando estudos semelhantes em humanos, quando seu trabalho foi interrompido pela guerra. Já em 1948, Figge e col. demostraram que a fluorescência vermelha da hematoporfirina acumulada podia ser utilizada na visualização e delineação de tecidos neoplásicos malignos ***(Figge 1948)***, com isto, Schwartz e col., sugeriram inicialmente que porfirinas poderiam ser terapeuticamente benéficas como agentes radiossensibilizadores

seletivos na terapia do câncer *(Schwarts 1955)*. Contudo, injeções de um derivado de hematoporfirina (HpD) em pacientes com tumores malignos não potencializaram os efeitos da radiação por R-X. Hoje sabe-se que *porfirinas, são potentes agentes citotóxicos anticâncer quando expostos a radiação vermelha,* pois elas funcionam como mediadores de transferência de energia na produção de estados ativados do oxigênio (estados singlete). Porsteriormente, perceberam que os componentes impuros utilizados na mistura bruta de porfirinas eram mais importantes para o processo de localização do tumor do que a própria hematoporfirina pura. Assim, durante as décadas seguintes, várias publicações descreveram efeitos, *in vitro*, de fotossensibilizadores e luz em moléculas, vírus e organismos uni e multicelulares.

No início dos anos 60, Richard Lipson *(1960)*, em sua tese de Mestrado utilizou as propriedades fluorescentes de um particular derivado de hematoporfirina (mediante um tratamento da hematoporfirina comercial com ácido sulfúrico seguido de hidrólise em meio básico), afim de conseguir resultados mais reprodutíveis e confiáveis para detecção de tumores malignos mas somente em 1966 realizou o primeiro tratamento em *um paciente* (metastase na parede do tórax de câncer de mama) *(Lipson 1966)*. Apesar da resposta positiva, Lipson não prosseguiu em seus estudos para tratamento em outros pacientes.

Em 1972 foi testada a idéia de que hematoporfirina poderia servir como um agente seletivo fotossensibilizante. Este estudo mostrou que após administração de hematoporfirina, seguida por luz, foi letal para glioma em cultura e também produz destruição massiva em gliomas (contendo porfirina) transplantados subcutaneamente em ratos *(Diamond 1972)*. Em 1976, Kelly e Snell *(Kelly 1976),* trataram *um paciente* com câncer de bexiga utilizando HpD e luz branca e, mesmo reportando uma resposta positiva, eles não prosseguiram com outros pacientes.

O re-interesse clínico pela terapia fotodinâmica tomou impulso graças a experimentos realizados por Dougherty e colaboradores, que iniciaram utilizando uma versão caseira do HpD de Schwartz e uma lâmpada de arco de xenônio filtrada para emitir luz na região do vermelho do espectro, mostrando que poderia causar completa remissão de tumores malignos transplantados em camundongos, sem dano excessivo na pele circundante também incluída no campo da luz ***(Dougherty 1974)***. Desde então, observou-se uma procura, por parte de pesquisadores, pela fotoquimioterapia que pode ser atribuída à caracterização e purificação das propriedades daquele derivado de Hematoporfirina (HpD). Em 1976, Weishaupt, identificou a produção de oxigênio em estado singlete como provável agente citotóxico nos tumores malignos, quando da ativação do HpD incorporado às células carcinogênicas com luz vermelha ***(Weishaupt 1976)***. Nos anos de 1977 e 1978 foram publicados os resultados relativos a *fase clínica experimental I e II* ***(Dougherty 1977, 1978)***. Dougherty trabalhou na caracterização da droga ***(Apêndice A)***, identificando os componentes ativos originários da mistura de porfirinas, introduzindo uma forma purificada comercial, conhecida como *Photofrin*, com excelentes resultados ***(Dougherty 1987)***. O *Photofrin* foi avaliado em animais de laboratório portadores de diversas estirpes tumorais, entre eles estão os carcinomas (de célula escamosa, de célula transicional, de célula basal, de adenóide cística), adenocarcinomas, tumores malignos de origem não epitelial como o glioma, melanoma, retinoblastoma, histocitoma maligno fibroso, liposarcoma, condrosarcoma e sarcoma de Kaposi ***(Zhou 1989)***.

Em 16 de abril de 1993 o *Health Protection Bureau of Canada* anunciou a aprovação para comercialização do *Photofrin* para profilaxias de câncer papilar de bexiga. A aprovação para tratamento com PDT de câncer esofágico e endobronquial estava ainda pendente. No final do

mesmo ano, a PDT foi liberada no Japão para tratamentos de câncer esofágico, endobronquial, de estômago, cervical e câncer de bexiga em estado inicial ***(Dougherty 1993)***. Nos E.U.A, a provação pelo FDA, da utilização da PDT para tratamento de câncer em estado inicial só aconteceu no ano de 1995.

Para uma boa performance da PDT, estudos "*in vivo*" mostraram que, no caso de lesões superficiais, a irradiação com uma simples fonte de luz pode ser suficiente. Para o tratamento de tumores volumosos, é utilizado um conjugado de fibras introduzidas no interior do tumor. No tratamento de lesões em órgãos cavitários, é conveniente a utilização de um bulbo como perfil difusor ***(Wilson 1986)***.

Os avanços na tecnologia *LASER* tem contribuído em muito para o desenvolvimento da fotoquimioterapia. Sendo *uma fonte de luz monocromática, coerente e de alta intensidade*, ela permite estimular eficientemente níveis específicos de energia. Sua utilização, substituindo lâmpadas convencionais filtradas, como fonte de luz para fotoquimioterapia, facilitou o procedimento, reduzindo o tempo de aplicação no paciente, além de facilitar o tratamento em regiões de difícil acesso, como por exemplo no interior de vísceras ocas. Um dos avanços recentes mais práticos na PDT é a disponibilidade de lasers de diodo como fonte de luz. Além de ser um sistema compacto, o custo de um sistema deste tipo é aproximadamente ¼ de um típico "Argon-dye Laser". Estes sistemas são muito atrativos e podem contribuir para popularizar este tipo de tratamento.

Atualmente a PDT, vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada por muitos grupos do mundo. *No Brasil* a primeira referência documentada sobre o assunto foi em 1986, por Abrahão e Goldenberg, onde estes apresentaram um artigo de revisão sobre o assunto ***(Abrahão 1986)***.

Os primeiros trabalhos experimentais a nível nacional tiveram início em 1984 na UNICAMP no grupo interdisciplinar coordenado pelos professores J.H. Nicola e E.M.D. Nicola, dando origem ao primeiro trabalho de pós-graduação, sobre o assunto no Brasil ***(Zezell 1987)***. Na ocasião, seguindo a metodologia de Lipson e colaboradores ***(Lipson 1961)*** foram sintetizadas e avaliadas as propriedades ópticas da hematoporfirina e de alguns derivados. Em *tese de Doutorado*, também no mesmo grupo, baseando-se em conceitos de *Espectroscopia óptica,* fora estudados os processos para monitorar e otimizar a PDT em tumores, sugerindo a idéia de que o fornecimento de oxigênio em *condições hiperbáricas* poderia aumentar a eficiência terapêutica da PDT ***(Zezell 1991)*** e independentemente ***(Jirsa Jr 1990, 1991)***. Em 1992, Gusmão, ainda no mesmo grupo desenvolveu em *dissertação de Mestrado*, um modelo experimental utilizando uma neoplasia maligna de rato, para o *Diagnóstico PDT* através da ação fluorescente do HpD, confirmando a seletividade do fotossensibilizador para um histofibrosarcoma ***(Gusmão 1992)***. Estes estudos forneceram a base logística e entusiástica para a realização do presente trabalho.

1. Motivação.

Estudos mostram que *tecidos neoplásicos possuem um suprimento crítico de oxigênio molecular, ou seja, abaixo do considerado normal (hipóxia e/ou anóxia)* **(Vaupel 1974)**. Um achado de considerável relevância clínica é que *o processo fotodinâmico pode, por ele mesmo, consumir oxigênio a uma taxa suficiente para inibir seus próprios efeitos* **(Tromberg 1990, Foster 1992)**. Com isso, a eficiência de fotoinativação de células malignas pela PDT é reduzida com a diminuição da concentração de oxigênio no meio intracelular. Testes *"in vivo"* mostraram que quando o meio celular, no caso carcinoma, é submetido à atmosfera com 1% de O_2, a eficiência da fotoativação se reduziu a 50%, quando comparada àquela do meio saturado. Já com atmosfera de N_2 puro, nenhuma fotoinativação foi observada **(Lee 1984, Moan 1985)**. Com isto, poderemos inferir que se saturarmos o meio celular com O_2 puro, através de *condições Hiperbáricas de oxigenação*, ou seja, elevarmos a PO_2 do tecido a níveis clínicos acima do normal, poderemos *aumentar o fornecimento de oxigênio singlete* dentro do meio e portanto aumentar a eficiência da PDT, como sugerido por *Zezell e Nicola* **(Zezell 1991)**.

2. Objetivos.

Nossa proposta foi comparar os resultados da PDT em *condições Normais* e *Hiperbáricas*, onde *mostramos, sistematicamente, que o acréscimo no suprimento de oxigênio no interior do tecido tumoral, em condições apropriadas, proporcionadas pelo aumento da pressão parcial do oxigênio* PO_2, *intensifica o processo* PDT *favorecendo a morte celular da região tratada.* Para isto, desenvolvemos uma câmara hiperbárica experimental simples, e de baixo custo, que permite estudos de terapia fotodinâmica de tumores, graças a "janelas" ópticas convenientemente projetadas.

CAPÍTULO 2

CÂNCER COMO UMA DOENÇA

"O câncer mata porque o tecido canceroso compete com os tecidos normais pelos nutrientes. Visto que as células cancerosas proliferam indefinidamente, seu número se multiplica dia após dia, pode ser facilmente compreendido que as células cancerosas, dentro de pouco tempo, exigirão toda a nutrição disponível para o corpo. Como resultado, os tecidos normais, gradativamente sofrem morte nutricional ***(Arthur C. Guyton).***"

1. Introdução.

Em uma *célula normal*, o equilíbrio funcional e estrutural depende do seu programa genético de metabolismo da diferenciação e especialização, da coesão com células vizinhas, e viabilidade de substratos metabólicos. A palavra *homeostasia* é usada pelos fisiologistas para significar *manutenção das condições constantes, ou estáticas, do meio interno.*

O *câncer* é causado, na maioria das vezes, por *mutação ou por ativação anormal de genes celulares* (Oncogenes), *que controlam a mitose e o crescimento celular*. Estas células mutantes, de maneira geral, apresentam *menor capacidade de sobrevivência,* pois *células cancerosas são, com grande frequência, destruídas pelo sistema imune do corpo antes que possam formar um câncer. "Este fato, leva a supor que grande número de cânceres seja simplesmente resultado de uma infeliz ocorrência* ***(Guyton 1991)***". Entretanto, *a probabilidade de ocorrência de mutações pode ser aumentada* de muitas vezes quando a pessoa é exposta a determinados fatores Físicos, Químicos e Biológicos, entre eles: *Radiação ionizante* (R-X, R-γ, UV); *Irritantes físicos* (abrasão do tecido); *Compostos químicos* (carcinógenos); *Tendência hereditária*, entre outros.

2. Tipos de câncer.

Neoplasia literalmente significa "novo crescimento", e este novo crescimento é um "neoplasma". O termo "tumor" foi originalmente aplicado ao crescimento do tecido devido a uma intumescência (protuberância), hoje este termo é sinônimo de neoplasma. *Oncologia (*do grego "oncos"=tumor) é, portanto o estudo de tumores ou neoplasmas. *Câncer* é o termo comum para *todos os tumores malignos*. As propriedades abaixo *definem a malignidade* deste tipo especial de célula:

1. *Anaplasticidade.* Células cancerosas são *menos diferenciadas* do que as células normais de origem tanto *morfológica* como *funcionalmente.*
2. *Invasão.* Células cancerosas são capazes de *invadir tecidos e organismos vizinhos* devido a secreções de certas enzimas.
3. *Metastase.* Células cancerosas estão propensas a *migrar do tumor primário e moverem-se através do corpo para sítios distantes*, onde desenvolverão novos tumores.

Tumores benignos não exibem as propriedades acima, e são considerados "curáveis", entre estes tem-se: fibroma, condroma, adenoma, papiloma etc...

Tumores malignos, se não tratados adequadamente, podem ser fatais, e podem ser classificados de uma maneira genérica como: *Carcinomas* e *Sarcomas. Carcinoma é um câncer derivado originalmente de células embrionárias epiteliais*. Tecidos que se desenvolveram a partir do epitélio embrionário incluem: pele, o envoltório de muitos órgãos, os órgãos respiratórios, do trato urinário, pulmão, bexiga e esôfago. *Sarcoma é um câncer derivado originalmente de células de tecido embrionário conjuntivo (mesenquima).* Tecido conjuntivo inclui músculo, osso e cartilagem. Sangue e vasos linfáticos derivam originalmente de tecido conjuntivo, portanto, *leucemias e linfômas são classificados como Sarcomas.*

3. Aspectos gerais sobre a biologia do câncer.

3.1. Ciclo celular.

É através da *Mitose*, que células cancerosas, assim como as células normais, se dividem para formar pares idênticos de células irmãs. Para que isto ocorra, a célula deve percorrer um número determinado de fases, durante o qual várias substâncias necessárias são manufaturadas para o processo da mitose ser completado. Estas fases são conhecidas como *ciclo celular*. Um ciclo celular típico pode ser representado esquematicamente como mostra a **Figura 2.1.** O ciclo completo consiste de uma fase mitótica, **M**, uma fase G_1 ("Gap" - período variável de tempo quando a célula sintetiza substâncias para sobreviver), uma fase replicativa de síntese de um DNA, **S**, e uma fase G_2 onde a célula manufatura substâncias, proteínas principalmente, para o processo físico da divisão celular, preparando-se para a próxima divisão. Uma célula pode sair do ciclo tanto no período G_1 ou G_2, entrando no período G_0 (estado de repouso ou latência) ***(Baserga 1979)***.

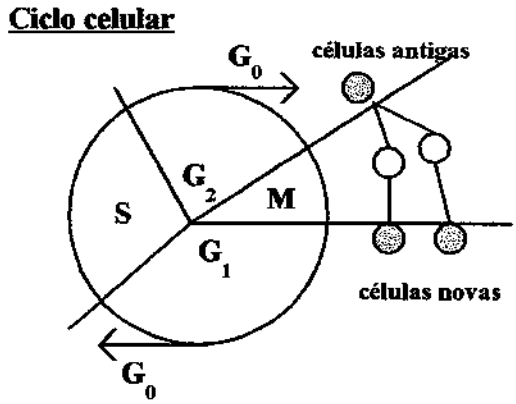


Figura 2.1: Ciclo celular esquemático do tumor de um mamífero ***(Baserga 1979)***.

Células na fase S do ciclo celular são *susceptíveis a muitas drogas* anticâncer. As células que supostamente estão na transição entre G_1-S e/ou estão na transição entre G_2-M são *sensíveis à radiação* ***(Hill 1992)***.

Anatomicamente, todos os tumores possuem 2 componentes básicos: O *Parênquima*, constituído de *células proliferativas* (células que estão em uma fase ativa - G_1,S,G_2,M), e *Estroma*, feito de *tecido conjuntivo e vasos*.

Imediatamente após a transformação maligna, visto através de microscopia óptica, as células cancerosas e as suas células normais de origem apresentam poucas diferenças visíveis. Contudo, enquanto o crescimento tumoral procede, as células cancerosas podem tornar-se cada vez mais alteradas apresentando *diferenças estruturais e funcionais* significativas. A **Tabela.2.1** mostra as *principais diferenças estruturais* das células cancerosas.

Características	Células malignas
Raio do núcleo - citoplasma	Aumentado
Raio do núcleo - nucléolo	Aumentado
Coloração nuclear	Aumentada
Frequência de divisões celulares	Aumentada
Aparência do cromossomo	Frequentemente anormal
Número de cromossomos	Frequentemente aumentada
Células gigantes multinucleadas	Mais comuns
Mitocôndrias	Número decrescido
Citoplasma	Frequentemente com inclusões
Membrana celular	Estrutura simplificada
Anaplasia	Aumentada

Tabela 2.1: Diferença estrutural de células cancerosas em relação a células normais ***(Lederle 1989).***

A **Tabela 2.2.** lista algumas das *diferenças funcionais* mais significativas entre as células normais e as cancerosas.

Características	Célula normal	Célula maligna
Inibição contactual	Param de dividir com o contato	Crescem desgovernadamente
Fator de crescimento	Requerido	Não requer ou necessita reduzir
Coesividade	Crescimento celular por toda à superfície	Células crescem em suspensão
Motilidade	Não frequentes	Usuais
Resposta para ativadores	Sensíveis a estímulo	Insensíveis a estímulo
Transplantabilidade	Raro	Usual
Tamanho da culturabilidade	Curta	Longa

Tabela 2.2: Diferença funcional *entre células cancerosas e células normais* **(*Lederle 1989*).**

4. Aspectos básicos sobre Injúria e Morte celular *(Cotran 1994).*

Uma *disfunção na homeostasia celular*, causada por estímulos externos (exógenos) ou internos (endógenos), pode induzir a uma Injúria e posteriormente à morte das células que sofrem este estímulo. Entre os fatores exógenos mais importantes podemos citar:

1. *Hipóxia* (oxigenação inadequada do sangue) e/ou *desbalanceamento nutricional*, geralmente devido a uma *Isquemia anterior* (deficiência no suprimento sanguíneo).
2. *Agentes físicos*: temperatura elevada *(hipertermia)*, pressão atmosférica, radiação (levando a defeitos genéticos), choque elétrico etc...
3. *Agentes químicos e drogas* como: Glicose ou sal em concentrações hipotônicas, oxigênio em altas concentrações com a formação de radicais livres, venenos, substâncias poluentes e etc...
4. *Agentes infecciosos* como: Vírus, bactérias, fungos etc..

A célula pode responder a um estímulo através de: *adaptação* (atrofia, hipertrofia. etc.), *dano reversível, alterações subcelulares, inclusões, acumulação intracelular, calcificação patológica* e/ou *morte*. Obviamente, estamos interessados nos *danos irreversíveis*.

Os mecanismos moleculares responsáveis pela morte celular são complexos, mas existem 4 *sistemas intracelulares* que são relativamente *vulneráveis*:

1. *A manutenção da integridade da membrana celular*, no qual a homeostasia iônica e osmótica das células e suas organelas dependem. Um dano na membrana plasmática da célula é um fator central na patogênese da injúria celular irreversível.
2. *A respiração aeróbia celular*. Hipóxia afeta *fosforilação oxidativa* e consequentemente a *síntese do suprimento vital de ATP* (Adenosine TriPhosphate).
3. *Síntese de enzimas e proteínas estruturais*.
4. *Preservação da integridade do aparato genético da célula*.

Em coadjuvância com a *Técnica cirúrgica*, a integridade de cada um destes descritos acima é aproveitado afim de causar morte celular nas terapias anticâncer.

Qualquer que seja o agente estimulador, existem *4 temas bioquímicos* comuns que parecem ser importantes na *mediação da injúria e morte celular*, entre eles:

1. *Oxigênio e radicais livres derivados de oxigênio. Espécies ativadas de oxigênio possuem como alvo biológico membranas, ácidos nucléicos e proteínas.*
2. *Cálcio intracelular e perda de homeostasia cáustica.* Isquemia e certas toxinas causam um aumento prematuro na concentração de cálcio citosólico (Ca^{2+}), proporcionando o influxo deste através da membrana. O aumento de Ca^{2+} ativa, como por exemplo: *fosfolipase* - promove dano na membrana, *proteases* - decomposição da membrana e proteínas cistoesqueléticas, *ATPases* - exaustão de ATP, e *endonucleases* - *associadas com a fragmentação da cromatina* **(Walker 1994).**
3. *Esgotamento de ATP.* O esgotamento do ATP assume um papel importante na perda da integridade da membrana plasmática, que caracteriza a injúria.
4. *Defeito na permeabilidade da membrana.* Estes defeitos podem ser resultados de uma série de eventos envolvendo exaustão de ATP, ativação modulada de cálcio, etc...

Reconhece-se atualmente, *duas expressões morfológicas* de morte celular, a *Necrose* e a *Apoptose* . A *Necrose ou necrose coagulativa* refere-se ao espectro de mudanças morfológicas, que seguem a morte da célula no tecido vivo, originadas da *ação progressiva degradativa da digestão enzimática* e da *desnaturação de proteínas* da célula na injúria letal. O processo ocorre *imediatamente após o estímulo exógeno*.

Apoptose é um evento mais regulado onde suas manifestações morfológicas *não ocorrem imediatamente após o estímulo* exógeno, e só recentemente foi reconhecido como *um importante caminho de injúria celular,* distinto da *necrose coagulativa* comum **(Kerr 1972)**. Este novo conceito sobreviveu mais de 15 anos de dormência, e *hoje é um dos mais vigorosos processos investigados na biologia.* Os *principais indicativos morfológicos* da apoptose são: *condensação e fragmentação da cromatina*.

4.1. Mecanismo da apoptose.

O caminho pelo qual a Apoptose é induzida é complexo, depende de muitos fatores e ainda é motivo de extensivos estudos. Contudo, a sequência de eventos que a apoptose atravessa parece estar estabelecida, como veremos a seguir:

1. *Condensação da cromatina.* Esta troca é associada com a clivagem do DNA nuclear ocorrendo em regiões ligadas entre nucleossomos, para produzir uma série de fragmentos que são *múltiplos de 180-200 pares de bases*. Cada fragmento dá uma característica de *padrão de escada* para as células apoptóticas em gel de agarose. Este padrão contrasta com o padrão difuso de DNA aleatório que ocorre na necrose. Esta fragmentação internucleossômica do DNA é mediada por uma endonuclease sensitiva ao cálcio. A endonuclease é ativada pelo aumento de cálcio induzindo fragmentação no DNA causando a condensação da cromatina.
2. *A alteração no volume celular e forma* tem sido atribuído em parte a indução, com células apoptóticas, de atividade *transglutaminase*. Estas enzimas causam extensivo "cross-linking" das proteínas citoplasmáticas, formando uma concha abaixo da membrana plasmática similar a da queratinização de células escamosas.
3. *Fagocitose dos corpúsculo apoptóticos* por macrófagos e outros tipos de células é mediado por receptores destas células, o qual ligam-se e engolfam as células apoptóticas.
4. *Um importante fator da apoptose é sua dependência em muitos (mas não todas) instâncias na ativação do gene e novas sínteses de proteínas.*
5. Certos genes envolvidos no crescimento e na causa do câncer (oncogenese e genes supressores) disputam um papel regulatório na indução de apoptose.

"*No organismo saudável*, a Apoptose é solicitada naturalmente na *destruição programada de células indesejáveis na embriogênese e metamorfoses, involução de dependência hormonal no adulto, esgotamento celular em proliferação de células, morte celular em tumores, morte de células imunes, atrofia patológica de tecidos hormônio-dependentes, morte celular induzida por células citotóxicas T, injúria celular em certas doenças virais, morte celular produzida por uma variedade de estímulos injuriosos que são capazes de produzir necrose*".

A **Figura 2.2** mostra um diagrama ilustrativo das características da apoptose.

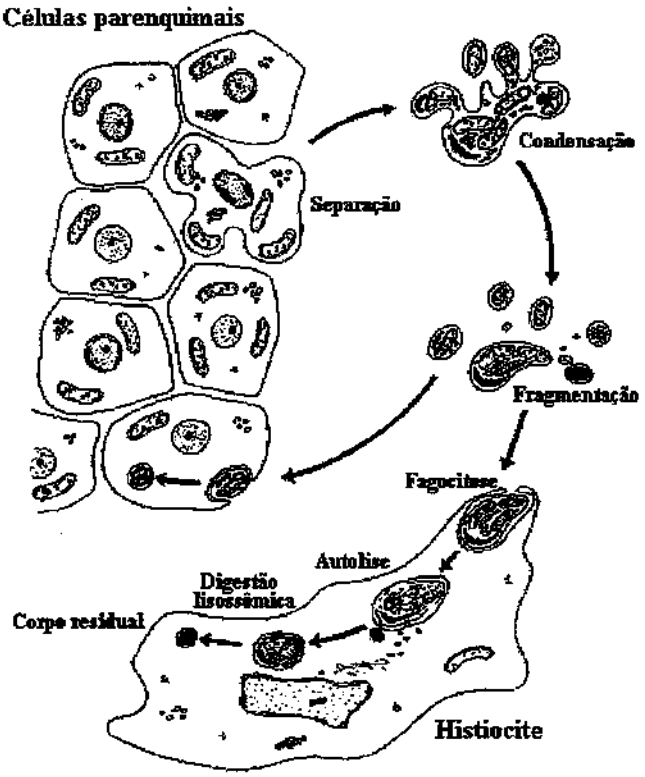


Figura 2.2: Diagrama ilustrativo das características morfológicas da apoptose ***(Kerr 1972).***

*"A palavra **Apoptosis** é usada em Grego para descrever o 'desprender' ou 'cair' das pétalas das flores, ou das folhas das árvores **(A.R. Currie)**".*

As *principais diferenças* entre as expressões de morte celular estão resumidas na **Tabela 2.3** abaixo:

	NECROSE	APOPTOSE
Estímulo	• Hipóxia • Toxinas	• Fisiológico • Patológico
Histologia	• Expansão celular • Necrose coagulativa • Organelas desorganizadas	• Células simples • Condensação da cromatina • Corpúsculos apoptóticos
Mecanismos de quebra de DNA	• Aleatório • Depleção difusa do ATP • Injúria da membrana, • Danos por radicais livres	• Internucleossômico • Ativação genética • Endonuclease
Reação no tecido	• Inflamação	• Sem inflamação • Fagocitose de corpos apoptóticos

Tabela 2.3: *Principais diferenças* envolvendo necrose e apoptose ***(Cotran 1994).***

5. Caminhos da PDT para destruição tumoral *(Peng 1996)*.

Segundo Peng e colaboradores, o conjunto de resultados descritos na literatura, sugerem 2 principais caminhos de destruição tumoral via PDT que são:

1. *Destruição Indireta.* Caminho iniciado pela destruição do sistema vascular (endotélio e outros componentes da parede vascular) e/ou matriz intercelular, seguida por hipóxia (e/ou anóxia) tecidual, que finalmente resulta na morte de células neoplásicas.
2. *Destruição Direta.* Neste caminho, células tumorais morrem como consequência do mau funcionamento de, por exemplo, funções mitocôndriais e de sistemas de biomembranas celulares.

5.1. Destruição indireta de células tumorais.

As evidências sugerem, em muitos casos, que a destruição tumoral mediada pela PDT-HpD seja devido primariamente ao dano vascular induzindo hipóxia/anóxia nas células tumorais e necrose. A PDT induz, em pouco tempo após irradiação, certos distúrbios patofisiológicos em arteríolas, capilares e vênulas pós-capilares, como constrição e/ou vasodilatação pela agregação de células do sangue e plaquetas. Isto diminui o fluxo de sangue e finalmente leva a completa perda no fluxo normal. Este processo pode parcialmente ser mediado por uma resposta inflamatória, iniciado pela destruição de células endoteliais (provavelmente também por plaquetas circulantes) resultando em *hiperemia, edema e trombose*, e finalmente em hipóxia/anóxia como necrose de células neoplasicas. Este processo é aumentado pela liberação de compostos vasoativos *(fosfolipase A_2, prostaglandina, tromboxana A_2)*, infiltração de neutrófilos no estroma do tumor e talvez influenciado por reações imunes.

5.2. Efeito fotossensibilizante direto em células neoplasicas.

Estudos mostram que a resposta direta de células tumorais para PDT pode ser favorecido pelo uso de *lipossomos de baixa densidade (LDL)* como "carregadores" de HpD, e do intervalo de tempo ótimo entre injeção da droga e irradiação da luz onde observou-se que algumas enzimas transmembranosas, ATPase e citocromo oxidase, foram muito sensíveis a PDT. Pela técnica de ^{31}P-NMR foi possível demonstrar que a redução dos níveis de ATP em carcinomas mamários tratados com PDT-HpD é uma resposta direta e inicial do tecido tumoral para PDT e mais apropriadamente causado pela inibição da função mitocondrial *(Ceckler 1986, Hilf 1987).*

A **Figura 2.3** mostra um diagrama generalizado dos possíveis caminhos de destruição via PDT.

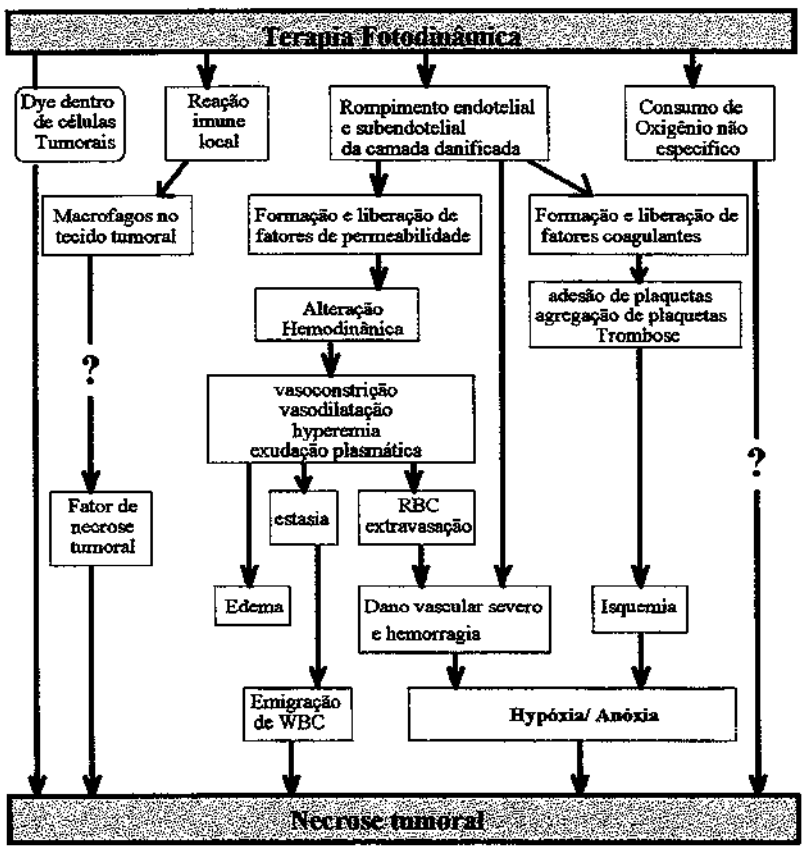


Figura 2.3: Diagrama proposto para o caminho da destruição tumoral *(Peng 1996).*

CAPÍTULO 3

LUZ E TECIDO BIOLÓGICO

"No novo cenário, as idéias de distinção (entre partículas e ondas) desapareceram porque descobriram-se que todas as partículas possuem propriedades ondulatórias e vice-versa. Nenhum dos dois conceitos deve ser descartado, eles devem sim ser amalgamados. Qual o aspecto que se impõe não depende do objeto físico, mas sim, do aparato experimental utilizado para examiná-lo ***(Erwin C. Schrödinger).***"

1. Introdução.

No momento em que tratamos de entender a interação da radiação eletromagnética com o tecido vivo, fica difícil apresentar um capítulo constando apenas os aspectos físicos e um outro com os aspectos biológicos. Assim, neste capítulo apresentamos a "mecânica" da interação luz-tecido biológico com enfoque especial aos interesses dos objetivos do trabalho de tese proposto. Na primeira parte do capítulo estabelecemos a conceituação física indispensável ao entendimento do assunto sem os detalhes exigidos em um trabalho de física pura, porém, com indicações claras da aplicação biológica. Na segunda parte, apresentamos os aspectos gerais da molécula de O_2 no tecido.

2. Luz e laser.

Antes de mais nada, é bom salientar que tudo o que se fala sobre Luz, aplica-se para o Laser, apenas, Laser possui alguns propriedades particulares como *monocromaticidade, coerência* e *colimação*, as quais não afetam a conceituação de luz propriamente dita.

Quando nos referimos à luz, geralmente falamos em cor, frequência, comprimento de onda, energia dos fótons e intensidade. A interligação entre tais conceitos depende; do observador ("cor" tem sentido somente para o ser humano que identifica uma fração do espectro eletromagnético através do seu olho"); do modelo físico ("frequência e comprimento de onda" correspondem ao modelo ondulatório e "fóton" ao modelo corpuscular.

Para a luz (ou laser) propiciar a PDT, ela tem que, inicialmente penetrar no tecido. O *modelo ondulatório* facilita o entendimento da propagação. A absorção da luz pelo fotossensibilizador e o restante do processo são melhor entendidos através do *modelo corpuscular*.

3. Modelo ondulatório da luz no tecido biológico.

As equações que governam os fenômenos eletromagnéticos são descritas pelas *Equações de Maxwell* **(3.1-3.4)**. Um aspecto básico destas equações é a existência de soluções sob a forma de **ondas** caminhantes que transportam energia de um ponto a outro ***(Jackson 1983)***:

$$\vec{\nabla}.\vec{D}=4\pi\rho \qquad \text{(Lei de Gauss)} \qquad \textbf{(3.1a)}$$

$$\vec{\nabla}.\vec{B}=0 \qquad \text{(inexistência de monopolo magnético)} \qquad \textbf{(3.2a)}$$

$$\vec{\nabla}\times\vec{E}=-\frac{1}{c}\frac{\partial\vec{B}}{\partial t} \qquad \text{(Lei de indução de Faraday)} \qquad \textbf{(3.3a)}$$

$$\vec{\nabla}\times\vec{H}=\frac{4\pi}{c}\vec{J}+\frac{1}{c}\frac{\partial\vec{D}}{\partial t} \qquad \text{(Lei de Ampère)} \qquad \textbf{(3.4a)}$$

onde **E** é o campo elétrico.
D=ε**E**+**P** é chamado deslocamento elétrico.
ε é a permissividade do meio.
ρ é a densidade de carga do meio.
c e a velocidade da luz no vácuo (≅3x10^8 m/s).
B é a indução magnética.
H=**B**/μ-**M** é o campo magnético.
μ é permeabilidade do meio.
σ é a condutividade do meio.
J=σ**E** (Lei de Ohm).

Consideremos preferencialmente um *meio linear* homogêneo, isotrópico e fisicamente em repouso. Nestas condições, **D**=ε**E** e **H**=**B**/μ. Portanto podemos rescrever as equações como:

$$\vec{\nabla}.\vec{E}=\frac{4\pi\rho}{\varepsilon} \qquad \textbf{(3.1b)}$$

$$\vec{\nabla}.\vec{B}=0 \qquad \textbf{(3.2b)}$$

$$\vec{\nabla}\times\vec{E}=-\frac{1}{c}\frac{\partial\vec{B}}{\partial t} \qquad \textbf{(3.3b)}$$

$$\vec{\nabla}\times\vec{B}=\frac{4\pi\mu\sigma}{c}\vec{E}+\frac{\mu\varepsilon}{c}\frac{\partial\vec{E}}{\partial t} \qquad \textbf{(3.4b)}$$

A solução deste conjunto de equações, mostrada a seguir, levará a resultados em termos de ondas planas muito próximas do comportamento da radiação de um laser.

Inicialmente, estamos interessados em estudar a propagação de ondas eletromagnéticas num meio livre e homogêneo. Para isso, desacoplamos matematicamente a equação **(3.4b)**, tomando o operador matemático (**∇x**) em ambos os lados da equação.

$$\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times\vec{B})=\frac{4\pi\mu\sigma}{c}(\vec{\nabla}\times\vec{E})+\frac{\mu\varepsilon}{c}\frac{\partial}{\partial t}(\vec{\nabla}\times\vec{E})$$

onde **E** é assumido ser uma função "bem comportada" (contínua e sem singularidades). Substituindo **(3.3.b)** na equação acima temos:

$$\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times\vec{B})=-\frac{4\pi\mu\sigma}{c^2}\frac{\partial\vec{E}}{\partial t}+\frac{\mu\varepsilon}{c^2}\frac{\partial^2\vec{E}}{\partial t^2}$$

O *vetor produto triplo* pode ser simplificado fazendo uso do *operador identidade*:

$\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times\vec{B})=\vec{\nabla}.(\vec{\nabla}.\vec{B})-\nabla^2\vec{B}$, e como $(\vec{\nabla}\cdot\vec{B}=0)$, ficamos: $\nabla^2\vec{B}=\frac{\mu\varepsilon}{c^2}\frac{\partial^2\vec{B}}{\partial t^2}+\frac{4\pi\mu\sigma}{c^2}\frac{\partial\vec{B}}{\partial t}$

e similarmente para **(3.3.b)** para um meio *sem carga* **(ρ=0)** $\nabla^2\vec{E}=\frac{\mu\varepsilon}{c^2}\frac{\partial^2\vec{E}}{\partial t^2}+\frac{4\pi\mu\sigma}{c^2}\frac{\partial\vec{E}}{\partial t}$

Para **σ=0** (meio não condutor):

$$\nabla^2\vec{B}-\frac{\mu\varepsilon}{c^2}\frac{\partial^2\vec{B}}{\partial t^2}=0 \quad ; \text{ e analogamente } \quad \nabla^2\vec{E}-\frac{\mu\varepsilon}{c^2}\frac{\partial^2\vec{E}}{\partial t^2}=0$$

Equação de uma Onda

onde no vácuo (ou ≅ ar) $\mu \cong 1$ e $\varepsilon \cong 1$.

A equação acima tem uma as soluções bem conhecida de *Onda Plana* propagante no espaço na *velocidade de fase* **c** (da luz) com um comprimento de onda **λ** como mostra **Figura 3.1.**

Em óptica, o coeficiente da velocidade da luz no vácuo pela velocidade da luz num certo meio é chamado de *índice de refração* η deste meio (em relação ao vácuo).

$$\eta\equiv\frac{c}{\upsilon}=\sqrt{\frac{\mu\ \varepsilon}{\mu_0\varepsilon_0}}=\sqrt{K_eK_m}$$

onde K_e é a permissividade relativa do meio.
K_m é a permeabilidade relativa do meio, para o tecido biológico $K_m = 1$.

Pode ser demonstrado que os campos **E** e **B** são perpendiculares entre si e também à direção de propagação. A **Figura 3.1** mostra uma onda eletromagnética congelada no tempo e no espaço.

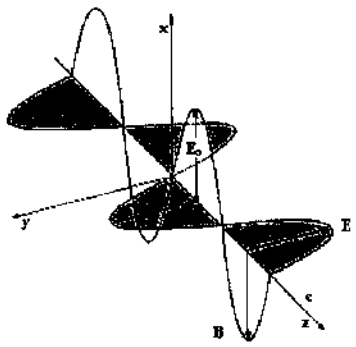


Figura 3.1: Configuração básica de uma onda eletromagnética plana "congelada" no espaço e no tempo. Os campos **E** e **B** são perpendiculares entre si e também a direção de propagação ***(Hecht 1987).***

4. Propagação da luz na matéria.

Trataremos agora do processo pelo qual a luz se propaga através de um meio diferente do vácuo. *Dispersão* é a dependência de η com o comprimento de onda λ (ou cor) da luz. Esta pode ser facilmente entendida pelo exame da interação da onda eletromagnética incidente com a rede de átomos que constitui o meio. Admitindo que se tenham **N** moléculas por unidade de volume, com f_i osciladores por molécula, pode ser demonstrado que:

$$\eta^2(\omega) \cong 1 + \frac{N q_e^2}{\varepsilon_0 m_e} \sum_j \left(\frac{f_j}{\omega_{0j}^2 - \omega^2} \right)$$

Equação da Dispersão

onde q_e é a carga e m_e é a massa de repouso do elétron.
ω_0 é a frequência de ressonância do oscilador.

Para $\omega \neq \omega_0$ a *dispersão é normal*, e é caracterizada por η predominantemente real. Neste caso *o material é "transparente" à radiação*, e a parte imaginária positiva representa dissipação de energia da onda eletromagnética para o meio em forma de *espalhamento*.

Para $\omega \approx \omega_0$ *(ressonância)* a *dispersão é anômala* apresentando η predominantemente imaginário. As regiões imediatamente próximas a ω_0 são chamadas de *Bandas de absorção*.

A **Figura 3.2** mostra um *diagrama esquemático do espectro eletromagnético,* mostrando relações entre frequência, comprimento de onda e as várias outras unidade de energia.

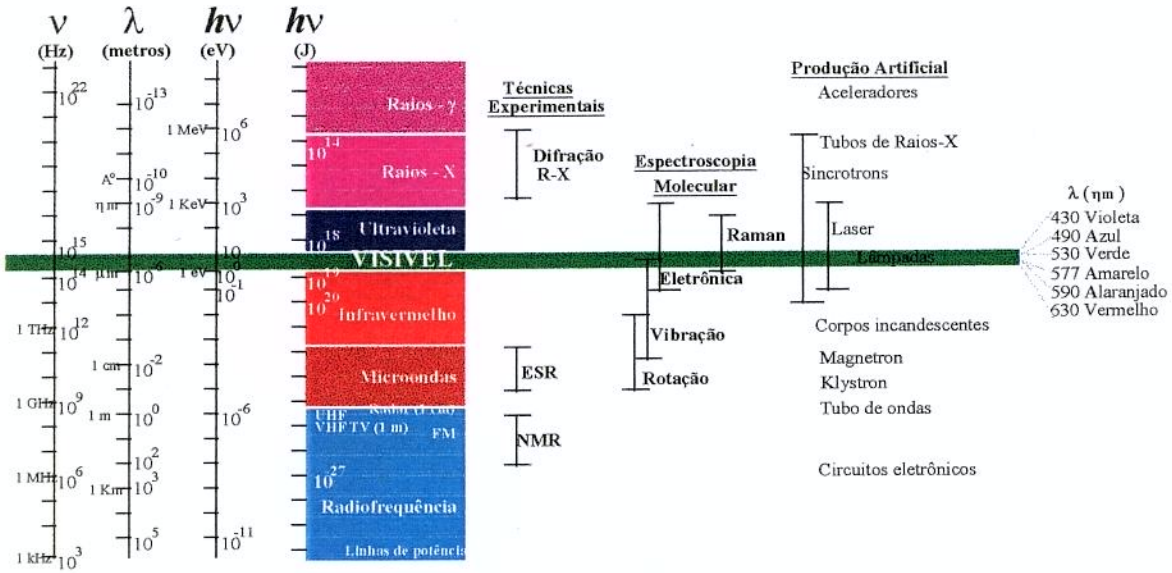


Figura 3.2: Diagrama esquemático do espectro eletromagnético ***(Hecht 1987).***

Em um *meio Dispersor*, temos a equação:

$$\nabla^2 \vec{E} + \mu\varepsilon \frac{\omega^2}{c^2} \vec{E} = 0 \quad \text{e analogamente} \quad \nabla^2 \vec{B} + \mu\varepsilon \frac{\omega^2}{c^2} \vec{B} = 0$$

Equação de Helmholtz:

As soluções para **E** (ou **B**), considerando cada componente da frequência temos:

$$\vec{E} = E_0 e^{i\vec{k}.\vec{r} - i\omega t}$$

e tomando a parte real;

$$\vec{E} = E_0 \cos(kz - \omega t)$$

4.1. Irradiância.

Uma das propriedades mais significativas das ondas eletromagnéticas é que ela transporta energia. O fluxo de energia que atravessa uma determinada área em um determinado intervalo de tempo na direção de propagação da onda é dado pelo *Vetor de Poynting*, definido como:

$$\vec{S}=\frac{1}{2}\frac{c}{4\pi}\vec{E}\times\vec{H}^{*} \quad \text{ou} \quad \vec{S}=\frac{c}{8\pi}\sqrt{\frac{\varepsilon_0}{\mu_0}}|E_0|^2\hat{n}$$

Seu valor médio, é a *Irradiância (ou Intensidade)*:

$$I=\overline{S}=\varepsilon_0 c\left|\vec{E}\right|^2$$

Isto caracteriza a quantidade média de energia transportada pela *radiação* eletromagnética.

A *atenuação* de uma onda em um meio é expressa, com maior comodidade, em termos das partes real e imaginária do número de onda ***k***. Se o número de onda for escrito como:

$$k=\beta+i\frac{\alpha}{2}$$

O parâmetro α é conhecido como *coeficiente de absorção*. Assim a *Intensidade* de uma onda num meio dispersor cai com exp(-αz). Portanto:

$$I=I_0 e^{-i\alpha z}$$

A diminuição da intensidade em um meio qualquer, na direção do feixe incidente, pode ocorrer devido ao fato desta ser consumida na excitação dos átomos e também porque a luz é espalhada ou difundida.

5. Janela biológica.

Muitas moléculas orgânicas e água tem alta absorção na região UV. Ácidos nucléicos e proteínas exibem absorção máxima no intervalo entre 260-290ηm. Radiação *Infravermelha* penetra pouco, devido a sua forte absorção pela água e melanina. Na região *visível* do espectro, a absorção da luz pelo sangue se dá principalmente em λ=550ηm (hemoglobina) e λ=545/575ηm (oxihemolobina) ***(Wilson 1986)***.

6. Janela terapêutica.

A distribuição da luz no tecido é uma função complexa de propriedades ópticas do tecido. *A absorção e espalhamento da luz é dependente do comprimento de onda*. O decréscimo na intensidade da luz (fluência) no tecido exposto para um feixe de luz plano de diferentes comprimentos de onda, em função da penetração, é mostrado na **Figura 3.3**.

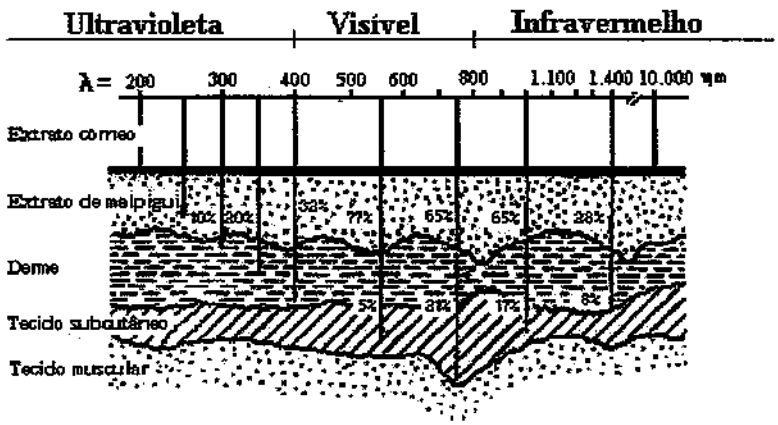


Figura 3.3: Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração para diferentes comprimentos de onda ***(Zezell 1991)***.

No visível a luz de comprimento de onda mais longo penetra melhor do que comprimento de onda mais curto. Entre *600-700ηm, não há competição de cromóforos endógenos*, e a profundidade de penetração no tecido é tipicamente 1-5mm.

7. Modelo corpuscular da luz no processo fotodinâmico.

Como apontado anteriormente, os aspectos ondulatórios da radiação eletromagnética tornam-se aparentes quando se investiga a maneira pelo qual a radiação se propaga, enquanto que os aspectos corpusculares tornam-se aparentes quando é investigada a interação da radiação com a matéria. Quantitativamente a equivalência entre uma onda eletromagnética, resultante da solução das equações de Maxwell, e os fótons é dada pela *relação de Einstein:*

$$\varepsilon = h\upsilon = \frac{hc}{\lambda} \tag{3.5}$$

onde ν é a frequência da onda
ε é a energia do fóton e
h é uma constante de proporcionalidade.

Alternativamente mostramos a relação com o comprimento de onda no vácuo (λ), onde "c" é a velocidade da luz, também no vácuo.

No caso da radiação do laser de HeNe, utilizado no presente trabalho, **λ=632,8ηm,** resultando pela equação **(3.5)** em um fóton de **ε≅1,96 eV**.

Em sua tese de doutoramento (1924), Louis DeBroglie, sugeriu que como a luz possuía propriedades quer de partículas, quer de onda, conforme era conhecido, talvez a matéria - em particular, elétrons - pudesse também apresentar ambas as características. Em decorrência desta simples idéia, a interação da radiação com a matéria (absorção e emissão) é geralmente estudada com o auxílio do modelo corpuscular da luz e ainda, com o auxílio de um formalismo matemático que não encontra similar clássico, isto é, através da Mecânica Quântica.

7.1. Postulados da mecânica quântica de interesse ao nosso estudo.

Anos depois, em 1926, Erwin C. Schrödinger demonstrou que a idéia de DeBroglie podia ser generalizada para abranger partículas ligadas (átomos e moléculas). Abaixo apresentamos os postulados que formam o alicerce básico da Mecânica Quântica:

Postulado 1: "O estado de um sistema é descrito por uma função de onda Ψ dependente das coordenadas espaciais e do tempo. Esta função contém todas as informações que podem ser determinadas sobre o sistema. Esta função deve ser matematicamente finita, contínua e quadraticamente integrável no espaço".

Postulado 2: Para todo observável físico existe um operador linear correspondente Hermitiano (operador com valor médio real). Para achar este operador, basta escrever a expressão clássica da mecânica para o respectivo observável em coordenadas cartesianas e correspondentes componentes de momentum linear, fazendo as seguintes substituições:

$$x \rightarrow \hat{X} \text{ e } p_x \rightarrow -i\hbar\frac{\partial}{\partial x}$$
$$y \rightarrow \hat{Y}$$
$$z \rightarrow \hat{Z} \qquad p_y \rightarrow -i\hbar\frac{\partial}{\partial y}$$
$$p_z \rightarrow -i\hbar\frac{\partial}{\partial z}$$

Postulado 3: Os valores possíveis que podem resultar das medidas de um observável físico G são os autovalores g_i da equação:

$$\hat{G}\Psi_i = g_i\Psi_i$$

onde $\hat{G}$ é o operador correspondente para a grandeza G. As autofunções φ_i devem ser necessariamente "bem comportadas".

Os níveis de energia de um determinado *sistema* (atômico e/ou molecular) podem ser obtido através da resolução da equação:

$$\hat{H}\Psi_n = E_n\Psi_n$$

Equação de Schorödinger independente do tempo.

Um solução genérica para os estados ψ que um *sistema* (simples ou complexo) pode assumir, são caracterizados pela função geral:

$$\Psi_{k,l,m}(\vec{r}) = R_{n,l}(\vec{r})\, Y_l^m(\theta,\phi)$$

onde $\mathbf{R_{nl}}$ é a *função radial* e $\mathbf{Y_l^m}$ são os *harmônicos esféricos (veja Cohen-Tannoudji 1977).*

Os números quânticos ***n*** *(principal),* ***l*** *(orbital) e* ***m*** *(magnético),* estão associados à:

Energia: $E_n = -\frac{E_I}{n^2}$ onde E_I é a energia de ionização do sistema com n=1,2,3....

Momento angular total: $L = \sqrt{\ell(\ell+1)}\hbar$ com ℓ=0,1,2,...(n-1)

Projeção do momento angular: $L_z = m\hbar$ com m= -ℓ, -ℓ+1,...0..., ℓ-1,+ℓ

O *número quântico spin* (s) é devido a propriedade magnética intrínseca do elétron. Não há equivalente clássico, e pode somente assumir os valores (s=+½, -½).

Cada função de onda ψ_n, solução da equação acima, define um *orbital* e as propriedades dos elétrons do *sistema* em estudo. *Uma imprecisa, mas pictorial, interpretação do orbital é uma nuvem eletrônica cuja densidade de probabilidade na região do espaço depende de valores de* ψ^2. Esta superficie limitante é uma representação de um orbital eletrônico.

Postulado 4: Se $\mathbf{G}$ é um operador Hermitiano que representa um observável físico, então as autofunções φ_i da equação de autovalor

$$\hat{G}\psi_i = g_i\psi_i$$

formam uma base completa.

A função de onda ψ pode ser expressa matematicamente pelo produto das autofunções dos operadores.

$$\Psi \approx \varphi_1\varphi_2\varphi_3 = \varphi_{Eletronica}.\varphi_{Vibracional}.\varphi_{Rotacional}$$

Os orbitais-φ podem ser essencialmente centrados em um núcleo *(orbital atômico)* ou em mais núcleos *(orbital molecular)*. Cada orbital pode acomodar não mais do que 2 elétrons e estes devem ser pareados (↑↓) *(Princípio de exclusão de Pauli)*.

Postulado 5: Se **Ψ(q,t)** é uma função estado normalizada de um sistema no tempo ***t***, então o *valor médio* de um observável físico G (ou elemento de matriz) no tempo ***t*** é definido como:

$$\langle G\rangle=\left\langle \psi \left| \hat{G} \right| \psi \right\rangle=\int_{V}\Psi^{*}\hat{G}\Psi\, d\tau$$

Postulado 6: O desenvolvimento do tempo de um estado de um sistema não perturbado é dado pela equação de Schrödinger dependente do tempo

$$-\frac{\hbar}{i}\frac{\partial\Psi}{\partial t}=\hat{H}\Psi$$

Equação de Schrödinger dependente do tempo

7.2. Transições quânticas.

A interação da radiação eletromagnética com a matéria é governada por algumas leis que dizem respeito ao espectro atômico, molecular e estrutural da matéria:

1. Um *sistema emissor-absorvedor* assume somente estados discretos definidos, que são caracterizados por energias totais definidas.
2. Quando o *sistema* emite ou absorve radiação, este, está fazendo uma transição de um estado para outro. Se o *sistema* passa de um estado de maior energia ε_f para um estado de menor energia ε_i, um fóton será emitido e a *frequência do fóton* será: $\nu=(\varepsilon_f-\varepsilon_i)/h$ onde h=6,63x10^{-34} Joules.seg (constante de ***Planck - 1900***).

Uma esquematização dos processos de transição entre 2 níveis de energia de um *sistema* na presença de um campo eletromagnético, é mostrada na **Figura 3.4.** *Muitas linhas ópticas emitidas pelos sistemas atômicos-moleculares correspondem a transições de dipolo elétrico.*

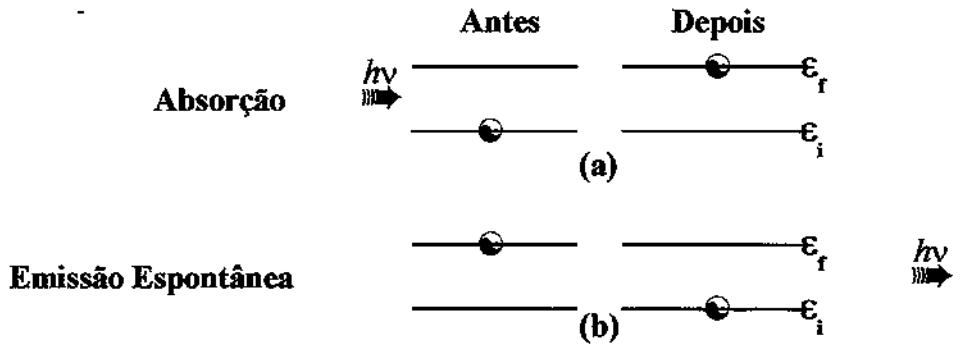


Figura 3.4: Representação esquemática do processo de transição entre 2 níveis de um sistema na presença de um campo eletromagnético externo *(Eisberg 1986)*.

Na *absorção*, o *sistema* no estado (ε_i) é promovido para o estado (ε_f) quando a radiação eletromagnética interage com o *ele*, sendo um fóton absorvido neste processo.

Na *emissão espontânea*, o *sistema* inicialmente no estado de maior energia (ε_f) decai para o de menor energia (ε_i) emitindo um fóton. Isto é devido a flutuações *da energia de ponto zero do campo eletromagnético*. O valor típico do tempo de vida para estes átomos excitados é de 10^{-8} s.

Desde que o elétron atômico possa ser encontrado em qualquer lugar onde a densidade de probabilidade for apreciável, a carga não fica restrita a um sítio particular. Com efeito, o *sistema* tem uma distribuição de carga que é proporcional à sua densidade de probabilidade. A absorção da luz por um *sistema* resulta principalmente da interação do vetor campo elétrico (**E**) da onda incidente com os elétrons do *sistema* atômico, podendo haver uma *mistura de dois autoestados quânticos*. Nestas condições a distribuição de carga oscila exatamente na frequência do fóton emitido na transição.

O *momento de dipolo elétrico* de uma molécula ($\mu=Qx$), é uma medida da separação do centro da distribuição de carga (**Q**) dos elétrons de um *sistema* ao ponto em estudo. *Como primeira aproximação, a natureza perturbativa que o campo elétrico da luz exerce sobre os elétrons de um sistema, é similar a interação do* ***E*** *com o momento de dipolo elétrico* (μ) *deste mesmo sistema.* Veremos com maior detalhe, as condições para que ocorram tais transições.

7.3. Regras de seleção para uma transição de dipolo elétrico.

As regras de seleção relacionam os números quânticos que caracterizam os estados inicial e final do *sistema* durante uma transição provocada por uma *perturbação*. Matematicamente, a existência de regras de seleção se deve ao *elemento de matriz* do momento dipolar possuir valor máximo quando as funções de onda do estado final e inicial, superpõem-se consideravelmente, durante a transição.

Seja $\hat{W}(t)$ a perturbação causada no *sistema* pela radiação incidente. Pode ser demonstrado que a *probabilidade de transição* de um *estado quântico* φ_f para φ_i é dada por:

$$\left|b_{fi}(t')\right|^2 = \left|\delta_{fi} - \frac{i}{\hbar}\int e^{i\frac{(\varepsilon_f^0 - \varepsilon_i^0)t}{\hbar}} \cdot \langle \psi_f | \hat{W}(t) | \psi_i \rangle \, dt\right|^2$$

A *expressão da perturbação* para este caso é dada por:

$$\hat{W}(t) = -(\mathbf{D}).\mathbf{E} = (qE_0)\, z \cos\omega t$$

com

$$z = r.\cos\theta = \sqrt{\frac{4\pi}{3}}\, r\, Y_1^0(\theta)$$

Assim o *elemento de matriz da transição* fica proporcional a:

$$\int_V Y_{lf}^{mf\,*} \cdot Y_1^0 \cdot Y_{li}^{mi} \cdot d\tau$$

Portanto haverá *transição (integral acima diferente de zero)*:

1. Entre estados de paridade diferente (par-impar): $\Delta\ell = \pm 1$

2. Quando o momentum angular for conservado: $\Delta m = 0, \pm 1$

3. Quando o spin for conservado: $\Delta S = 0$

Como os estados de spin são "transparentes" ao operador perturbativo, no cálculo do elemento da matriz, obteremos um resultado não nulo, somente quando não houver mudança de spin.

8. Moléculas diatômicas.

As reações fotossensibilizadas resultam da interação entre o fotossensibilizador ativado e o oxigênio presente nas células - levando ao chamado *efeito fotodinâmico* com a formação de *oxigênio singlete* ($^1O_2$). *A reação do oxigênio singlete com alvos biomoleculares é geralmente considerada como o caminho inicial para o dano fotodinâmico.* Uma molécula de oxigênio pode ser interpretada como um arranjo estável de um grupo de núcleos e elétrons, onde este conceito é uma extensão natural do conceito do átomo. A configuração exata de uma molécula é dada pelas forças eletromagnéticas e pelas leis da mecânica quântica, mas isso pode ser complexo mesmo quando são empregados métodos aproximativos. Entretanto, as propriedades de simetria de uma molécula podem oferecer informação qualitativas importantes sobre as funções de onda moleculares e propriedades de simetria.

Define-se *operação de simetria* à transformação de um corpo cuja posição final é fisicamente indistinguivel da posição original, contanto que as distâncias dos átomos sejam preservadas.

Diferentemente do caso atômico, onde não há direção preferencial, nas *moléculas diatômicas* a direção que une os dois núcleos é convencionalmente tomada como uma direção preferencial **z**. Assim a *Hamiltoniana da molécula,* onde somente a interação coulombiana é levada em conta, apresenta uma complexa invariância se realizarmos uma rotação ao redor do eixo **z**. Desta forma, a componente do momento angular **Lz** é *uma invariante* . Com isto, as autofunções eletrônicas ϕ_λ da molécula diatômica são autofunções simultâneas de **L** e **Lz**, ou seja;

$$H\Psi_\lambda = E_\lambda \Psi_\lambda$$

$$L_z\Psi_\lambda = m_z\hbar\Psi_\lambda = +\Lambda\hbar\Psi_\lambda \quad \text{onde } \pm\Lambda = 0,1,2,3...$$

De acordo com **Lz**, caracterizado por Λ, estabeleceu-se a seguinte notação espectroscópica.

Valor de Λ	0	1	2	3	4	...
momenta angular total dos elétrons (L)	Σ	Π	Δ	Φ	Γ	...
momentum angular individual de um elétron	σ	π	δ	φ	γ	...

Devido a *rotação ao redor do eixo z*, a molécula diatômica apresenta invariância com relação a trocas como $y_i \rightarrow -y_i$ e $x_i \rightarrow -x_i$. Esta invariância faz com que os estados $+\Lambda$ e $-\Lambda$ (desde que $\Lambda \neq 0$) sejam degenerados (mesma energia) duplamente. Esta dupla degenerescência é conhecida como *Dubleto* -Λ. Então temos;

$$A_y^2 \psi_{\Lambda=0} = a^2 \hbar \psi_{\Lambda=0} \quad com\ a = \pm 1$$

Desta forma, apesar do estado fundamental não ser degenerado, há **2** tipos de estados fundamentais distintos:

1. Σ^+, são aqueles que a ação de **Ay** ($y_i \rightarrow -y_i$) não muda o sinal da função de onda.

2. Σ^-, são aqueles cuja ação de **Ay** sobre a função de onda muda o sinal.

Para *moléculas Homonucleares* (caso do O_2) além do discutido acima, temos que os estados são invariantes por mudança do tipo $z_i \rightarrow -z_i$. Deste modo, o centro de massa da molécula é um *centro de inversão*, e consequentemente os estado energéticos se tornam invariantes por mudanças de $r_i \rightarrow -r_i$. Assim.

$$I^2 \psi_\Lambda = \alpha^2 \psi_\Lambda \quad com\ \alpha = \pm 1$$

Com isso, *a invariância por inversão dos estados eletrônicos* em moléculas diatômicas moleculares cria dois grupos de estados:

1. "g" *(gerade).* Aqueles cuja função de onda não muda o sinal por inversão $r_i \rightarrow -r_i$. (Σ_g, Π_g...)

2. "u" *(ungerade).* Estados cuja função de onda muda o sinal por inversão $r_i \rightarrow -r_i$, (Σ_u, Π_u...)

Assim temos que para moléculas homonucleares os estados eletrônicos de $\Lambda=0$ podem ser:

$$\Sigma_u^+, \Sigma_g^+, \Sigma_u^-, \Sigma_g^-$$

8.1. Configuração eletrônica do oxigênio *(Laustriat 1986).*

A distribuição eletrônica do átomo de Oxigênio (*segundo Pauli*) é dada por:

$$O\ (Z=8) = 1s^2, 2s^2, 2(p_x^2 p_y^1 p_z^1)$$

onde **s e p** são os orbital atômicos.
$\mathbf{p_{xyx}}$ são orbitais atômicos isoenergéticos da camada de valência.

Independentemente do modelo ou visualização da ligação, o fenômeno fisico responsável pela estabilidade de uma molécula é o abaixamento da energia potencial coulômbica, que ocorre quando os elétrons de valência sofrem atração dos núcleos. Em aproximação simples, *a combinação linear de 2 orbitais atômicos irá formar dois orbitais moleculares*, um de energia mais alta *(anti-ligante)* e outro de energia mais baixa *(ligante)* do que os orbitais atômicos. Assim, na *molécula de Oxigênio* **(Z=16)**, os orbitais atômicos 1s internos são mantidos próximos aos seus respectivos núcleos e são poucos afetados pelo fato destes estarem livres ou ligados quimicamente (são considerados *elétrons não ligantes*). Com isso, a configuração eletrônica de menor energia que representa os 12 elétrons de *valência* pode ser dada por:

$$(\sigma 2s)^2(\sigma^* 2s)^2(\sigma 2p)^2(\pi 2p_x)^2(\pi 2p_y)^2(\pi^* 2p_x)^1(\pi^* 2p_y)^1$$

onde Associado ao orbital **s**: σ = orbital ligante, σ^*= orbital anti-ligante.
Associado ao orbital **p**: π = orbital ligante, π^*= orbital anti-ligante.

No *estado fundamental* ($^3\Sigma_g^-$), o oxigênio é paramagnético e não pode reagir com moléculas diamagnéticas sem remover a restrição de spin. *Devido a sua natureza relativamente não polar, ele é muito mais solúvel em meio orgânico do que em água*. No primeiro *estado excitado* ($^1\Delta_g$ - *22kcal/mol*), *que remove a restrição de spin, ele é mais reativo* **(Foote 1968).**

A **Figura** 3.5 mostra a estrutura eletrônica da molécula de oxigênio resultante da separação dos orbitais atômicos, onde para o orbital mais externo $^1\pi_g$ constata-se:

1. Um elétron em cada orbital com spins paralelos ***(Fig.3.5.d)***: Esta configuração descreve a energia mais baixa *(regra de Hund)* e representa o *oxigênio molecular normal*, cujo estado fundamental é chamado *triplete* ($^3\Sigma_g^-$).
2. Os elétrons pareados no mesmo orbital ***(Fig.3.5.e)***, com spins opostos (*estado singlete* $^1\Delta_g$).
3. Elétrons com spins opostos localizados em 2 diferentes orbitais (estado singlete $^1\Sigma_g^-$-***Fig.3.5f***).

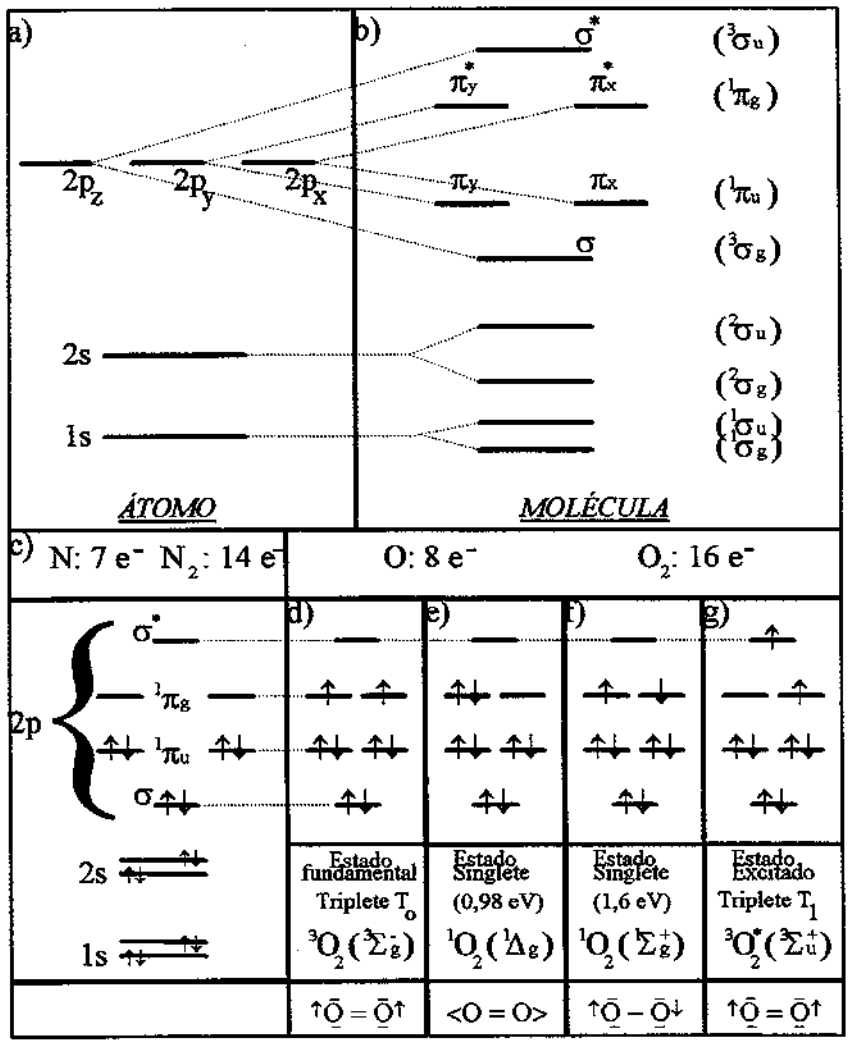


Figura 3.5: Orbitais atômico **(a)** e molecular **(b)** dos elementos **N, O.** Configuração eletrônica do: Nitrogênio **(c);** e da molécula de O_2 nos estados fundamental **(d)** e ativado **(e,f,g).**

O *oxigênio molecular* é ambíguo na natureza, isto é, ele é indispensável para a vida aeróbia. Contudo, uma vez que sua concentração está mais alta do que o normal, ele pode se tornar perigoso para o sistema vivo. Ele é o substrato de algumas enzimas (oxigenases, oxidases) e produto de outras (superóxido dismutase, catalases). Ele tem um caracter birradical responsável pela sua reatividade natural (oxidação) e por sua habilidade de aceitar elétrons (dando origem a íons superóxidos quimicamente ativos O_2^-, com baixa energia de ativação (0,16eV) ou também O_2^{2-} que perde sua característica de birradical desde que os elétrons de $^1\pi_g$ estejam pareados).

O *oxigênio singlete* tem uma energia de ativação mais baixa (0,98eV) e pode difundir através da membrana plasmática das células. Seu alvo biológico são membranas, ácidos nucléicos e proteínas. Neste estado, o oxigênio não tem mais as características de birradical, se comportando como uma molécula "duplo-ligada". Seu tempo de vida é relativamente longo na ausência de desativação interna ($\tau_0 \cong 2\mu s$ em H_2O). A energia mais alta (1,6eV) do estado singlete tem o tempo de vida mais curto ($\tau_0 \cong 10^{-10}\mu s$ em H_2O), e por esta razão, sua implicações no efeito fotodinâmico é insignificante. O estado singlete do oxigênio resulta da transferência de energia por processos colisionais e não da transição eletrônica para um orbital vazio. Este estado é gerado pela transferência de energia do mediador mas não por transição óptica originária do estado fundamental triplete, que em ambos os casos são triplamente *proibidas*: *por multiplicidade, por momento angular e por simetria.*

9. Aspectos gerais do oxigênio no tecido.

Uma vez entendida a limitação que o O_2 tem para, por absorção de fótons, transformar-se em singlete para causar a destruição celular, é necessário para o entendimento do presente trabalho, o conhecimento da distribuição do O_2 em tecidos em equilíbrio biológico.

9.1. Tecido normal.

O ar que respiramos, a uma pressão P=760mmHg ao nível do mar (1Kgf/cm^2) (Campinas P≅713mmHg), possui uma composição aproximada de 79% de Nitrogênio e 21% de Oxigênio. Nestas condições, a pressão parcial do oxigênio é PO_2≅160mmHg. Devido à umidificação do gás (vapor) e a uma *mistura venosa do sangue* no coração, a PO_2 do sangue bombeado para a aorta é de aproximadamente 95mmHg permanecendo assim até atingir os tecidos periféricos, onde o oxigênio é liberado nos líquidos teciduais, para *ser utilizado pelas células, na forma de oxigênio molecular dissolvido* (isto representa aproximadamente 97% de saturação habitual da hemoglobina). A PO_2 *intracelular* normal varia de 5-40mmHg tornando o sangue venoso com PO_2≅40mmHg (75% de saturação habitual). Como apenas 1-3mmHg da pressão de oxigênio são normalmente necessários para que ocorram as reação químicas intracelulares normais, *a baixa média do PO_2 celular de 23mmHg é suficiente* para garantir a sua sobrevivência com *um considerável fator de segurança* (***Guyton 1991***).

9.2. Tecido tumoral.

Raramente a distância célula-capilar é maior que 50μm. Normalmente, o oxigênio difunde dos capilares para as células com rapidez suficiente para suprir toda a quantidade necessária de oxigênio utilizado no metabolismo. Todavia, em ocasiões patológicas (tumores), células em crescimento desordenado, podem, pressionar algum vaso (provocando uma *isquemia* - deficiência no suprimento sanguíneo), e/ou, estarem distantes do limite de difusão oxigênio-capilar. Assim, a PO_2 intracelular pode cair abaixo do nível crítico de 1-3mmHg induzindo *hipóxia* (oxigenação inadequada do sangue) no tecido em questão (***Guyton 1991***).

Dois modelos gerais, mas não exclusivos, tem sido propostos para explicar a existência de células em hipóxia em tumores **(Figura 3.6).** O *modelo da Corda,* diz que células em hipóxia estão distantes do limite do intervalo de difusão do oxigênio aos vasos sanguíneos. O *modelo do fluxo sanguíneo oscilante,* diz que regiões do tumor abastecidas por um ou mais vasos sanguíneos podem tornar-se hipóxias por um curto período de tempo como um resultado de uma interrupção intermitente do fluxo sanguíneo.

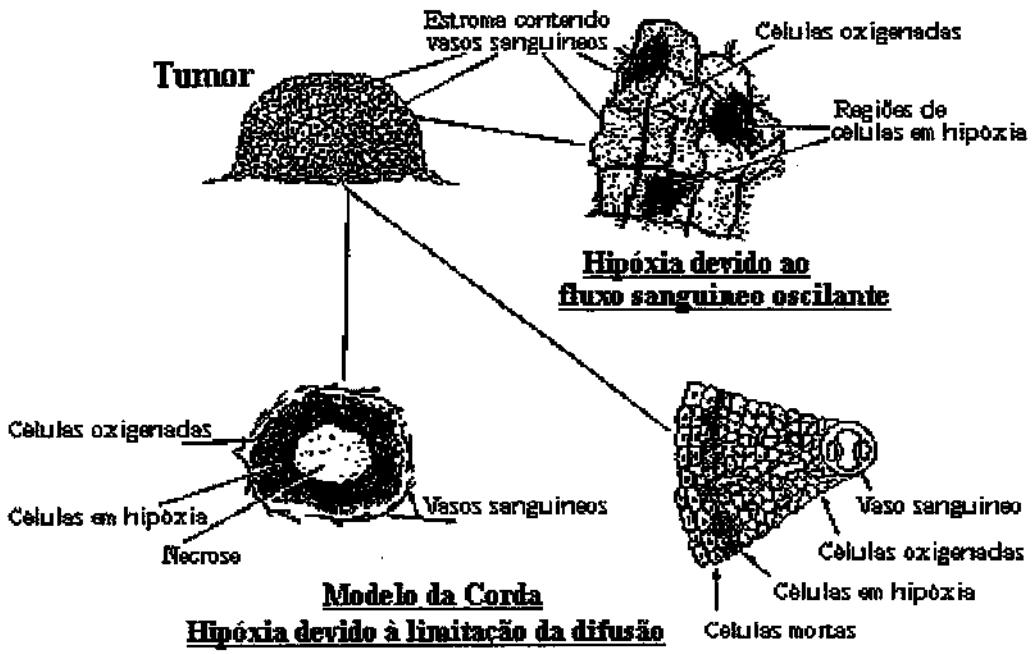


Figura 3.6: Ilustração esquemática de dois possíveis modelos para o desenvolvimento de hipóxia em tumores ***(Hill 1992).***

Constatou-se que em *Radioterapias,* células em hipóxia expostas a radiação ionizante são de 2-3 vezes menos sensíveis que células expostas a condições "aeradas" ***(Moan 1992).***

10. Aspectos gerais sobre pressões parciais de oxigênio.

10.1. Hiperoxigenação.

A respiração de oxigênio a uma concentração de 100% (Hiperóxia) pode mobilizar 5 vezes mais oxigênio para os alvéolos a cada respiração do que quando respira-se ar normal. Nestas condições a PO_2 alveolar aumenta em um número considerável de vezes, mas a PO_2 tecidual modifica-se muito pouco, devido a saturação da hemoglobina e a função tamponamento do oxigênio tecidual pela hemoglobina ***(Guyton 1991)***.

10.2. Ambiente hiperbárico.

Quando se entra em regiões de ar comprimido (hiperbarismo), o sangue nos pulmões é exposto a uma pressão gasosa alveolar extremamente elevada. Quando a PO_2 do sangue se eleva muito acima do nível crítico, o mecanismo tampão da hemoglobina-oxigênio não mantém a PO_2 *tecidual na faixa normal segura (entre 20-60mmHg)*, assim, uma quantidade acentuada de oxigênio apresenta-se dissolvida na água do sangue, e não ligada à hemoglobina ***(Guyton 1991)***.

Em Terapias com Oxigênio Hiperbárico (HBO), o oxigênio é geralmente administrado a 2-3 atmosferas de pressão por máscara ou tubo endobraquial, enquanto o gás em torno do corpo é ar comprimido com mesmo alto nível de pressão. Este procedimento é atualmente indicado, em medicina, para casos de *infecções necrotizantes de tecidos moles* (gangrena gasosa, etc..), *Isquemias agudas traumáticas* (lesões por esmagamento, etc..), *Lesões crônicas respiratórias, Lesões por radiação, Enxertos e retalhos, Queimaduras térmicas, Intoxicação por monóxido de carbono, Embolia gasosa, Hemorragia maciça, Doença descompressiva.*

Em *Terapias anticâncer*, a HBO permite o aumento da perfusão e sensibilidade tumoral, esta se mostrou ser um eficiente coadjuvante na Irradiação-X, particularmente em tumores superficiais ***(Mueler-Klieser 1983)***. Na *Quimioterapia*, o HBO permitiu oxigenar tecidos em hipóxia promovendo neovascularização ***(Alagoz 1995)***.

11. Fotossensibilizadores.

Uma substância química para atuar como um fotossensibilizador fototerápico deve ter primeiramente algumas propriedades especificas, à saber:

1. *Solúvel e Estável* em solução aquosa a *pH fisiológico.*
2. *Não tóxico a níveis terapêuticos,* com mínima morbidez para o hospedeiro.
3. *Transporte passivo na circulação* sanguínea.
4. *Transporte ativo na célula* com alvo bem estabelecido permitindo *retenção seletiva*
5. *Alto rendimento quântico*. A facilidade para absorver-emitir-transferir energia, caracteriza um excelente candidato a sensibilizador.

Sem sombra de dúvidas, os fotossensibilizadores mais estudados até os dias atuais são os Derivados de Hematoporfirina (HpD) ou sua forma mais purificada o *Photofrin.* Estudos indicam que o HpE e *Photofrin* consiste de **Hp**, **HVD** e **Pp** (responsáveis pelo efeito localizador da PDT) e de **DHEter** (responsável pelo efeito ativo da PDT) ***(Apêndice 4B).*** Estudos mostram que a **DiHematoporfirina *Éter* (DHEter)** é inativa como um agente anti-câncer *in vivo.* Contudo, em solução aquosa, este dímero é convertido em um material de maior peso molecular de apreciável atividade anticâncer a **DiHematoporfirina *Ester* (DHEster)** ***(Byrne 1990).***

Uma enorme quantidade de novos fotossensibilizadores tem sido sintetizadas durante os últimos anos. Alguns deles (chamados de fotossensibilizadores de segunda geração) estão sendo avaliados e propostos como fotossensibilizadores alternativos para a PDT, entre eles encontramos as *Ftalocianinas (Pc)*, os *Clorofilados*, os *Derivados de Benzoporfirinas (BpD.* Recentemente tem sido mostrado que a administração de δ-ácido aminolevulínico (δ-ALA, um precursor no caminho da biosíntese heme) pode resultar em um elevado síntese e acúmulo de porfirinas (principalmente Protoporfirina IX, PpIX) em alguns tipos de células/tecidos malignos ***(Colussi 1996).***

11.1. Transporte e localização do HpD *in vivo*.

A mais interessante propriedade da porfirina como uma droga anticâncer é a sua *seletividade*, que uma vez injetada intravenosamente, esta resulta em grandes concentrações, principalmente em tumores. Este fato é conhecido desde o início do século, contudo, o mecanismo pelo qual as porfirinas acumulam-se nos tumores ainda não esta claramente entendido. Lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (LDL), são eficientes transportadores de porfirinas hidrofóbicas no sangue e podem liberar estes fotossensibilizadores para o tecido através de receptores específicos. Além do mais, várias linhas de células neoplasicas expressam maior quantidade de receptores LDL do que seu correspondente celular normal (*Maziere 1990*).

Uma esquematização mostrando o transporte e a localização de fotossensibilizadores e seus subsequentes alvos fotodinâmicos é sugerido na **Figura 3.7**.

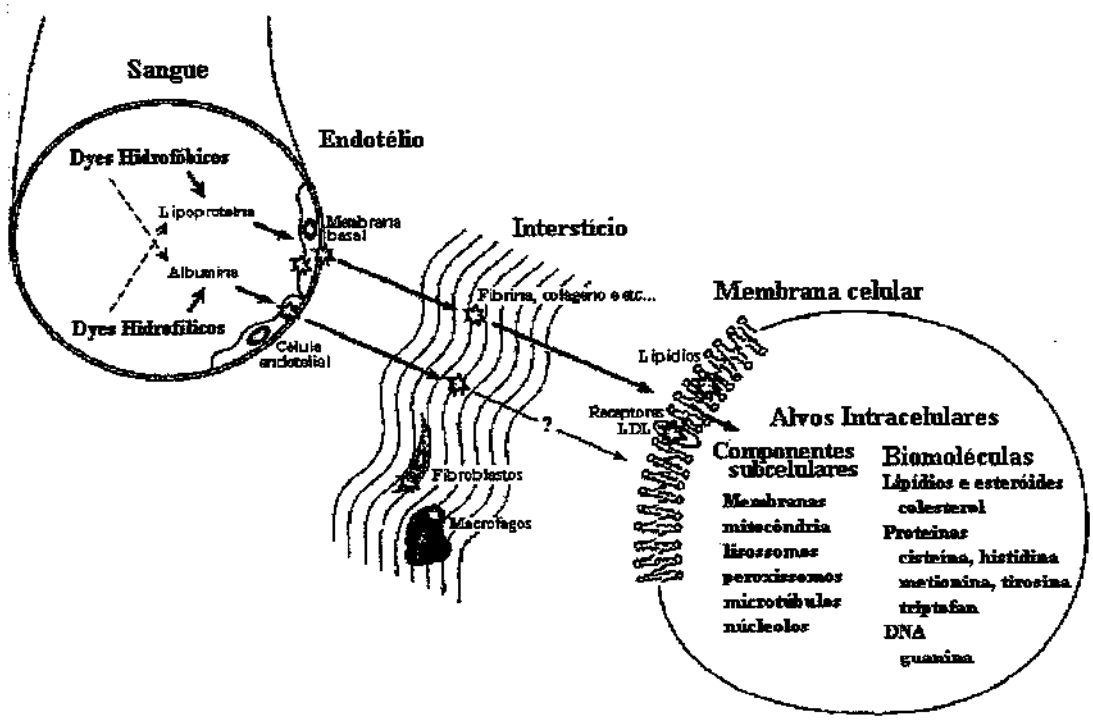


Figura 3.7: Transporte e localização dos fotossensibilizadores, e supostos alvos (Π) fotodinâmicos de tumores *in vivo* (*Peng 1996*).

O padrão de localização do corante *in vivo* é bastante complexo, e depende de vários fatores. Foi observado em condições de hipóxia crônica, desbalanceamento na produção e consumo de prótons, e produção de excesso de ácido produzido dentro das células ***(Brault 1990).*** *Estes resultado podem influenciar no processo de retenção e seletividade via PDT.*

Embora muita informação tenha sido obtida com respeito a retenção de fotossensibilizadores em células/tecidos, *poucos artigos se dirigiram a padrões de localização de corantes em tecido normal e tumoral.* Nestes estudos, os compartimentos vasculares e intersticiais do tumor sólido têm recebido considerável atenção pois dados morfológicos mostraram que a *permeabilidade e a vulnerabilidade vascular são significativamente maiores no tecido tumoral do que no tecido normal.* Constata-se que corantes *hidrofílicos* são transportados principalmente por albuminas e globulinas e distribuídos na vascularização estromal do tecido tumoral. Muitas drogas *hidrofóbicas* são preferencialmente incorporadas a lipoproteinas e localizadas nas células neoplasias. Desta forma, presume-se que as porfirinas incorporam-se nas células por difusão passiva através da membrana plasmática ***(Peng 1996).*** Esta interação com a membrana pode ser visualizada na **Figura 3.8.**

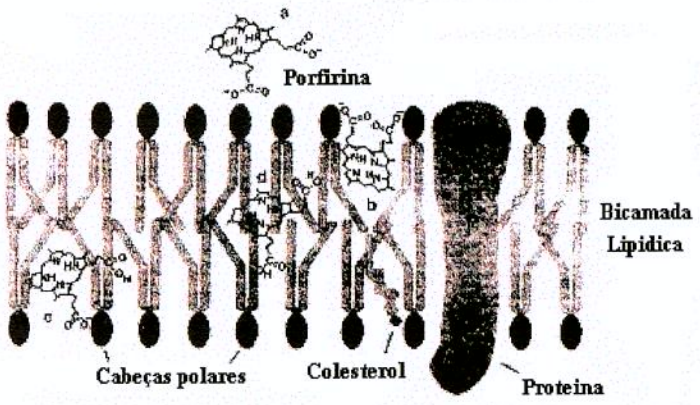


Figura 3.8: Esquema da uma membrana mostrando as moléculas de porfirina difundindo na bicamada lipídica de acordo com seu estado de protonação ***(Brault 1990).***

CAPÍTULO 4

TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA À HIPEROXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA

"A pesquisa do câncer tem arruinado muito mais reputações do que ela tem propriamente feito (Carl Sternberg)."

1. Introdução.

A *Terapia Fotodinâmica (PDT) do câncer* tipicamente envolve uma sequência de eventos, começando com a administração endovenosa, no 'paciente', de um fotossensibilizador. Este composto químico é retido preferencialmente no tecido maligno por várias horas, quando é ativado por luz de comprimento de onda apropriado - correspondendo a sua banda de absorção. A transferência de energia, de forma não radiativa, deste fotossensibilizador para o oxigênio molecular existente induz a morte seletiva das células cancerosas.

A PDT tem-se tornado uma importante modalidade clínica no tratamento do câncer. Uma variedade de diferentes tipos de tumores e em muitas localizações como: metastases em pulmões; brônquios; bexiga; esôfago; pele; cabeça e pescoço; parede do tórax; e cérebro têm sido tratados com PDT ***(Dougherty 1987, Dougherty 1993).*** O potencial promissor da PDT é, portanto, devido à habilidade do sensibilizador em ficar retido em maior quantidade no tecido maligno do que em tecidos sadios ***(Weishupt 1976)***, bem como o da excitação da sequência de fenômenos físicos apresentados acima.

A interação da luz com um dado fotossensibilizador retido no tecido biológico e a interação deste com o oxigênio das células cancerosas corresponde à Terapia Fotodinâmica do câncer propriamente dita.

2. Derivados de hematoporfirina (HpD).

A retomada do interesse clínico da PDT no final dos anos 1970, pode ser atribuída a dois fatores:

1. A descoberta dos Derivados de Hematoprofirina **(HpD)** (e sua versão mais purificada, o *Photofrin*), como efetivos localizadores e fotossensibilizadores de tumores.
2. Ao desenvolvimento de lasers e sistemas de fibras ópticas apropriados.

Tanto *"in vitro"* quanto *"in vivo"*, o **HpD** tem propriedades superiores de localização e fotossensibilização quando comparado com a hematoporfirina **(Hp)** comercial ***(Maziere 1990).***

A composição do *Photofrin* tem sido objeto de muita discussão durante os últimos anos. O *Photofrin* e seu precursor, **HpD** são obtidos mediante um tratamento com ácido acético-sulfúrico, seguido de hidrólise em meio básico, da Hematoporfirina comercial **Hp** ***(Zezell 1987).*** O resultado é essencialmente um *composto Hidrofóbico constituído por uma mistura de esteres e éteres oligomericos da Hematoporfirina* ***(veja Apêndice B).***

A **Figura 4.1** mostra o *Espectro padrão de Absorção* e de *Emissão Fluorescente* de um **HpD**.

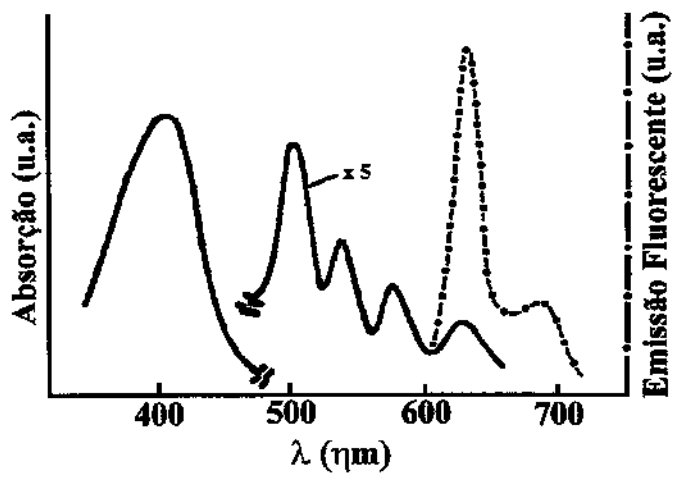


Figura 4.1: Espectro de absorção *(curva cheia)*, e emissão fluorescente para excitação com λ≅400ηm *(curva tracejada)* de um HpD ***(Wilson 1986).***

3. Mecanismos moleculares de fotossensibilização *(Laustriat 1986).*

Muitos são os mecanismos que estão envolvidos em reações fotossensibilizantes:

(i) Absorção ressonante de um fóton pelo fotossensibilizador (Transição radiativa).

(ii) Transferência de energia de excitação para o fotossensibilizador (Transição não radiativa).

(iii) Ejeção de elétron ou íon do fotossensibilizador, ou para este.

(iv) Formação de radicais livres seguida de reação química.

Pode-se esquematizar o processo de excitação e subsequente desexcitação de uma molécula orgânica **A** como:

$$A \xrightarrow{h\nu} A^* \begin{cases} \xrightarrow{B} \text{Radicais Livres } (R^*) \xrightarrow{O_2} \text{fotoprodutos (Tipo I)} \\ \xrightarrow{O_2} \text{Oxigenio Singlete} \xrightarrow{B} \text{fotoprodutos (Tipo II)} \\ \xrightarrow{B} \text{fotoprodutos (Tipo III)} \end{cases}$$

Estes tipo de reações, não raro, podem proceder simultaneamente e em competição.

3.1. Processos fotofísicos primários em um fotossensibilizador orgânico.

Em 1933 o físico Aleksander Jablonski propôs um diagrama de 3 níveis de energia para descrever o fenômeno de luminescência típico de muitos compostos orgânicos. A **Figura 4.2** mostra uma versão simplificada deste diagrama, mostrando um fotossensibilizador orgânico, com um par de elétrons em seu estado fundamental (S_0).

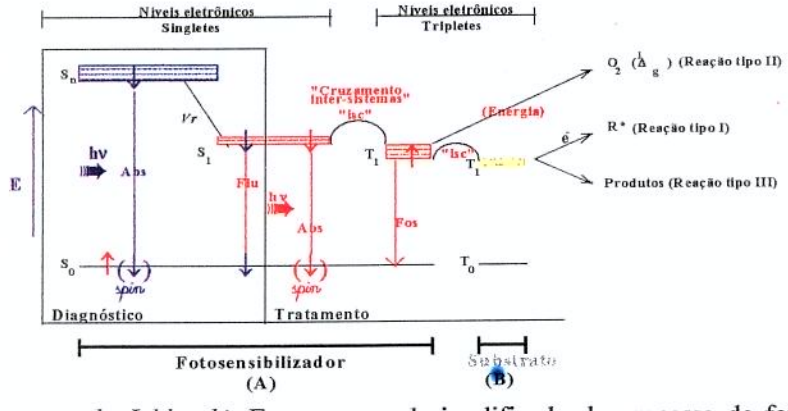


Figura 4.2: *Diagrama de Jablonski*. Esquema geral simplificado do processo de fotossensibilização mediado por um fotossensibilizador envolvendo conversão de fotoenergia para espécies quimicamente ativadas. Omitimos deste esquema, entre outros detalhes, maiores estados excitados (isto é, S_3, T_3, etc.).

Brevemente, o sensibilizador, no estado energético fundamental, é uma molécula com spin eletrônico emparelhado (↑↓-estado singlete S_0). A absorção de um fóton promove um dos elétrons para um orbital vazio excitado singlete S_n ou S_1 (v=0). Moléculas neste estado usualmente tem um tempo de meia-vida relativamente curtos ($\cong 10^{-9}$ seg) e são impossibilitadas de se envolverem em reações fotoquímicas *(Liu 1991)*. Após excitação, o elétron excitado pode decair prontamente para o estado fundamental por *4 principais processos* que competem na desativação do fotossensibilizador, que são:

1. *Emissão de luz* (Fluorescência, $S_1 \rightarrow S_0$).
2. *Formação de Radicais* (A*), pela conversão interna de energia.
3. *Formação de cátion* (A^+), por ejeção de elétron, e
4. *Cruzamento Intersistema* ("isc") para o estado triplete T_1, apartir da *"reversão de spin"*. O tempo de vida deste estado triplete é longo ($\cong 10^{-3}$ seg), uma vez que elétrons com spins paralelos (↑↑ ou ↓↓) favorecem a *processos biomoleculares*. Dependendo das condições do meio, podem ser favorecida *reações do tipo I, II, ou III*, como veremos a seguir:

3.1.1. Fotooxidação por radicais *(Reação tipo I)*.

Após o *cruzamento intersistema* o sensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular (via transferência de carga ou interagindo com o substrato do meio) havendo a formação de *íons superóxido* (O_2^-). O substrato comporta-se como um aceitador de elétron.

O íon superóxido (O_2^-), pode promover oxidação por vários diferentes caminhos, à saber:

1. Pela remoção de Hidrogênio do meio e formação de um Hidroperóxido *muito reativo* HO_2^-.

$$H_2O \text{ (ou AH)} + O_2^- \rightarrow OH^- \text{ (ou } A^-) + HO_2^-$$

2. Pela captura de um segundo elétron, levando o HO_2^{2-} e então formar H_2O_2.

$$HO_2^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

3. Pela perda de seus elétrons em uma reação de redução:

$$Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

pelo mesmo mecanismo de ação das enzimas protetora de superóxido dismutase SOD:

$$SOD(Cu^{2+}) + O_2^- \rightarrow SOD(Cu^+) + O_2$$

4. Por dismutação, formando um Oxigênio Singlete e H_2O_2

$$O_2^- + O_2^- \rightarrow {}^1O_2^* + O_2^{2-}$$
$$\llcorner\!\!_ + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

3.1.2. Fotooxidação pelo oxigênio singlete *(Reação tipo II)*.

A interação ressonante entre o *sensibilizador* no estado excitado e *oxigênio*, ambos no estado triplete, frequentemente resulta em um processo de transferência de energia *permitida por spin* formando *Oxigênio Singlete*. Esta espécie é altamente reativa no sistema biológico, podendo interagir com uma grande quantidade de proteínas, lipídios, e outras moléculas. Uma vez formado, o *Oxigênio Singlete* pode sofrer vários ***processos de desativação*** entre eles, enumeramos três:

1. *Emissão*. Este processo tem rendimento quântico muito baixo:

$$^1O_2^* \rightarrow {}^3O_2 + h\nu \text{ (fosforescência em } \lambda = 1.272\eta m).$$

2. *Desativação não radiativa* é principalmente induzida por um efeito de momento de dipolo da droga nos elétrons de oxigênio induzindo uma mistura de estados. Em água o acoplamento entre estes 2 estados é forte, e a desativação eficiente. Em lipídios (membrana celular), o acoplamento é fraco e o tempo de vida longo: $^1O_2^* \rightarrow {}^3O_2 + calor$.

3. *Supressão por inibidores específicos ("scavengers")*.

   a. Transferência de carga e subsequente desativação interna.
   b. Transferência de energia para o substrato (molécula B), no qual um eficiente cruzamento intersistemas promove a relaxação vibracional em calor, este é o caso do bem conhecido β-caroteno:

$$^1O_2^* + {}^1B \rightarrow {}^3O_2 + {}^3B^* \rightarrow {}^1B + calor$$

Por outro lado, vários tipos de ***reações químicas*** podem ocorrer mais eficientemente com o Oxigênio no estado singlete, resultando do caracter duplo ligante do $^1O_2^*$. Estas reações são de importância biológica, podendo afetar *membranas* (adição em cadeias acila R–C=O insaturadas de fosfolipídios), *proteínas e enzimas* (oxidação de aminoácidos: triptofano, histina, cisteína, e metionina), e ácidos nucléicos (guanosina), acarretando a morte celular. Estas reações, *em substratos oxidáveis* (SO_2^*), são eficientes pois o comprimento de difusão do $^1O_2^*$ é próximo de 0,2μm em água e 10μm em membrana lipídica ***(Moan 1990)*** - ordem de magnitude da distância entre organelas e células.

3.1.3. Reações que não envolvem oxigênio *(Reação tipo III)*.

Em geral estas reações ocorrem por transferência de carga e ejeção de prótons. A interação de transferência de carga entre sensibilizador triplete (Porfirina) e o aceitador de elétron (substrato) gera um íons radical, neste caso, *o ânion porfirina sofre ejeção de próton*.

Sob condições anaeróbias, os *psoralenos* presentes no meio reagem com moléculas especiais por um processo eletrofílico afim de formar derivados. *Este é um mecanismo proposto para a ação biológica usados em fotoquimioterapia de doenças de pele (vitiligo, psoríase, etc...).*

4. Terapia fotodinâmica do câncer propriamente dita.

A Terapia Fotodinâmica é fundamentada, conforme colocado anteriormente, no envolvimento de 3 componentes essenciais: Um *fotossensibilizador* específico que é retido no tecido tumoral, *fótons* de luz visível e *Oxigênio* molecular.

A **Figura 4.3** mostra de uma forma simplificada, os níveis eletrônicos e as várias transições possíveis (com suas respectivas taxas), tanto do fotossensibilizador, como do Oxigênio, envolvidos no processo *(Sterenborg 1996)*. Consideramos preferencialmente *reação do tipo II*.

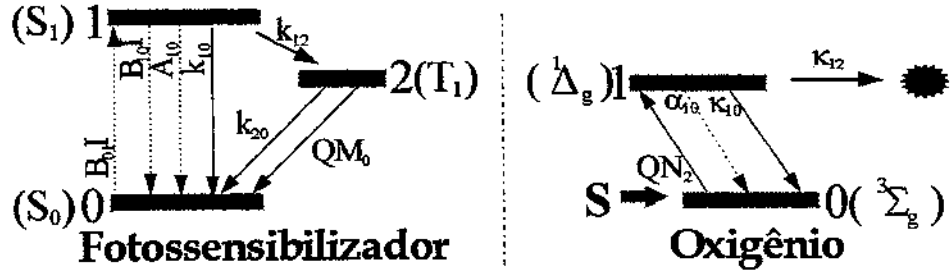


Figura 4.3: Esquema simplificado dos níveis eletrônicos do fotossensibilizador e do oxigênio.

Reação tipo II tem sido considerada como a principal quando o sensibilizador é do tipo HpD (ou HpE), entretanto uma prova conclusiva deste fato ainda não foi confirmada. Veremos em capítulos ulteriores que nosso trabalho contribui positivamente para esclarecer este ponto.

Para que haja morte celular, é necessário que o oxigênio reaja quimicamente com componentes da célula, em um ritmo bem maior do que em situação normal, causando reação oxidativa destrutiva. O oxigênio no seu estado fundamental ($^3\Sigma_g$) é menos reativo do que o oxigênio no estado singlete ($^1\Delta_g$), não pela energia somada ao sistema eletrônico mas sim pela configuração eletrônica propriamente dita.

A transição $^3\Sigma_g \rightarrow {}^1\Delta_g$ triplete-singlete do oxigênio por dipolo elétrico (absorção de radiação eletromagnética) é proibida, por conseguinte, vivemos em um meio onde existe abundantemente radiação eletromagnética na faixa do vermelho, e o oxigênio dos seres vivos permanece no estado fundamental triplete, sendo, portanto, moderadamente reativo.

A Terapia Fotodinâmica é um processo que permite promover o oxigênio para o estado singlete $^1O_2{}^*(^1\Delta_g)$. Isto é possível, conforme **Figura 4.2**, porque a proximidade oxigênio-fotossensibilizador propicia a transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio, por um processo não radiativo ("Quenching": uma interação de colisão induzida, no qual energia e momentum são transferidos do fotossensibilizador para a molécula de oxigênio). Como o fotossensibilizador pode absorver a radiação vermelha externa ($S_0 \rightarrow S_1$), e como o estado excitado singlete do fotossensibilizador está energeticamente muito próximo de outro estado da mesma molécula, porém triplete, há uma conversão para tal estado com a perda de uma pequena fração de energia da molécula como um todo (níveis rotacionais e vibracionais).

O nível eletrônico final triplete do fotossensibilizador é metaestável, e coincidentemente ressonante com o nível singlete (desocupado) do oxigênio, possibilitando a transferência não radiativa de energia para o oxigênio.

4.1. Modelo matemático.

4.1.1. Fonte de luz.

Consideraremos uma excitação luminosa contínua (CW) onde $I(t)=I_0$ [Wm^{-2}]. A distribuição de intensidade dentro do tecido varia fortemente no espaço e depende de coeficientes de absorção, de espalhamento óptico, bem como da morfologia do tecido. Este efeito complica seriamente a dosimetria óptica da PDT *(Wilson 1986)*. Devido a isto, neste trabalho, desenvolveremos uma *análise teórica local* da fotossensibilização.

4.1.2. Fotossensibilizador.

Um esquema simplificado dos níveis eletrônicos do HpD extraído da **Figura 4.3**, e o possível *caminho de excitação e desexcitação* são dados na **Figura 4.4.** Assumiremos somente *absorção linear*, isto é, a probabilidade de absorção é proporcional a taxa de excitação.

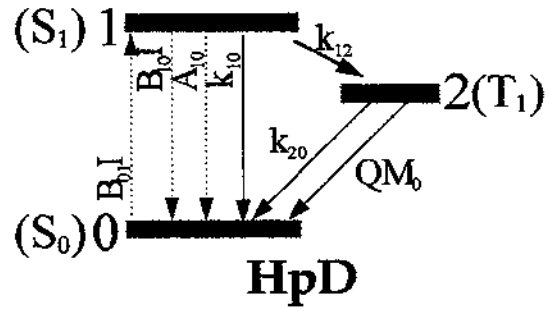


Figura 4.4: Esquema mostrando os níveis eletrônicos do fotossensibilizador e as várias transições possíveis, e respectivas taxas de transição. Linha pontilhada se refere a transições radiativas e linha sólida às transições não radiativas.

As *taxas de transição espontânea* [s^{-1}] do estado **i** para **j** são denominados pelos parâmetros A_{ij} e k_{ij}, com **k** se referindo a transições não radiativas e **A** a transição espontânea, onde um fóton é emitido. As *taxas de transição induzida* são representadas pelo parâmetro **B** [$s^{-1}m^2W^{-1}$]. Todos os parâmetros utilizados são macroscópicos, portanto, as unidades podem diferir daquelas baseadas nos parâmetros de Einstein para um átomo.

Assim, a *população e a depopulação* dos estados podem ser descritos pelo seguintes conjuntos de equações diferenciais:

$$\frac{dN_0}{dt} = -N_0 B_{01} I + N_1 \left(B_{10} I + A_{10} + k_{10} \right) + N_2 \left(k_{20} + Q M_0 \right) \quad (4.1)$$

$$\frac{dN_1}{dt} = N_0 B_{01} I - N_1 \left(B_{10} I + A_{10} + k_{10} + k_{12} \right) \quad (4.2)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = N_1 k_{12} - N_2 \left(k_{20} + Q M_0 \right) \quad (4.3)$$

onde N_0, N_1 e N_2 são as populações em [Kmol.m^{-3}] dos diferentes estados.
N_2QM_0 o decréscimo da população no estado triplete por "Quenching" [Kmol.m^{-3}.s^{-1}].
M_0 é a concentração de oxigênio no estado fundamental [Kmol.m^{-3}].
Q a taxa molar de "Quenching" [Kmol^{-1}.m^{-3}.s^{-1}].

Devemos ressaltar que o modelo aqui apresentado não inclui *"Photobleaching"*: destruição da molécula do fotossensibilizador como resultado da irradiação.

4.1.3. Oxigênio.

A **Figura 4.5**, extraída da **Figura 4.3**, mostra as transição possíveis entre os 2 estados de energia do oxigênio. O estado fundamental, $^3\Sigma_g$, com população M_0; e o estado excitado, $^1\Delta_g$, com população M_1.

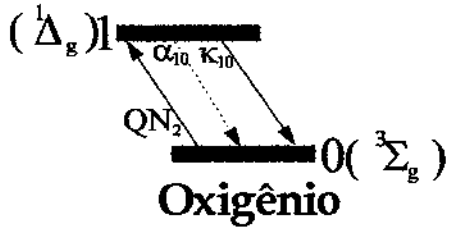


Figura 4.5: Esquema simplificado dos níveis eletrônicos do oxigênio.

A excitação do estado fundamental triplete para o estado excitado singlete pode somente ocorrer através do "Quenching" do estado triplete do fotossensibilizador. Depopulação do estado excitado singlete pode ocorrer por 2 diferentes caminhos: pela desexcitação radiativa ou não radiativa do estado fundamental (α_{10} e κ_{10}).

A população e depopulação dos estados, M_0 e M_1, são governadas pelas equações:

$$\frac{dM_0}{dt} = -M_0 Q N_2 + M_1\left(\alpha_{10}+\kappa_{10}\right) \tag{4.4}$$

$$\frac{dM_1}{dt} = M_0 Q N_2 - M_1\left(\alpha_{10}+\kappa_{10}\right) \tag{4.5}$$

onde α_{10} e κ_{10} representam as taxas de transição radiativa e não radiativa (singlete-triplete)

4.1.4. Dano fotodinâmico.

Como sabemos, o oxigênio no estado excitado singlete ($^1O_2$*) é extremamente reativo em sistemas orgânicos, onde na maioria das vezes é "consumido na PDT", a uma *taxa suficiente para inibir seus próprios efeitos* (**Tromberg 1990, Foster 1992**). Com isso, a eficiência de fotoinativação de células malignas pela PDT é reduzida com a diminuição do suprimento (S=S(t)) de oxigênio no meio intracelular. A **Figura 4.6** mostra esta situação.

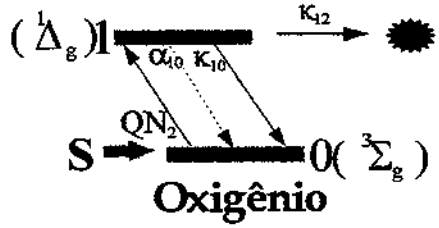


Figura 4.6: Esquema simplificado dos níveis eletrônicos da molécula de oxigênio presente no meio biológico. O Ψ representa estados ligados do oxigênio singlete.

Vamos introduzir o **parâmetro fotodinâmico, Ω**, que expressa *o número de células por unidade de volume que morrem como resultado da terapia* [m^{-3}]. Vamos supor que a taxa de aumento no dano seja proporcional ao número total de moléculas de oxigênio singlete que estão sendo consumidas, isto é, removidas do sistema:

$$\frac{d\Omega(t)}{dt} = \varepsilon M_1(t)\kappa_{12} \tag{4.7}$$

onde ε [$Kmol^{-1}$] é uma constante de proporcionalidade que expressa a sensibilidade do tecido para o oxigênio singlete, isto é, o número de células que morrem por unidade de volume por Kilomol de oxigênio singlete.

Com isto pedemos rescrever as Equações **(4.4 e 4.5)** obtendo:

$$\frac{dM_0}{dt} = -M_0 Q N_2 + M_1\left(\alpha_{10} + \kappa_{10}\right) + S(t) \qquad \textbf{(4.4')}$$

$$\frac{dM_1}{dt} = M_0 Q N_2 - M_1\left(\alpha_{10} + \kappa_{10} + \kappa_{12}\right) \qquad \textbf{(4.5')}$$

onde κ_{12} é a taxa no qual o $^1O_2$ é consumido por reações de oxidação e "scavengers".

S(t) representa um termo de suprimento de oxigênio (Kmol.s^{-1}).

Substituindo **(4.4')** em **(4.5')** e utilizando **(4.7)**, é fácil demonstrar que:

$$\boxed{\frac{d\Omega(t)}{dt} \propto S(t) - \frac{d}{dt}\left(M_0(t) + M_1(t)\right)} \qquad \textbf{(4.8)}$$

A expressão **(4.8)** mostra claramente que a taxa de *Dano fotodinâmico* está relacionada com a eficiência da transição entre os estados triplete e singlete dos oxigênio envolvidos na PDT e, diretamente proporcional ao suprimento de oxigênio molecular *S(t), que é uma complicada função da taxa de perfusão e gradiente de oxigênio local.* Isto assumindo um processo tipo II puro, isto é, que todo o dano biológico é mediado pelo oxigênio singlete.

5. Débito e suprimento de O_2 na terapia fotodinâmica.

A **Equação 4.8** que deduzimos na seção anterior pode ser representada esquematicamente pela **Figura 4.7**, permitindo uma visualização da importância do contínuo suprimento de oxigênio para a eficiência do processo fotodinâmico.

Desta forma, as células normais e as do tecido canceroso recebem um aporte de oxigênio controlado pelo organismo do qual eles fazem parte, que por sua vez, depende das condições físicas externas. Através do ambiente hiperbárico, é possível variar o aporte de oxigênio nas células em estudo ***(Freitas 1991)***, viabilizando a comprovação da dependência em oxigênio *mostrada pela primeira vez pela nossa* **Equação 4.8**.

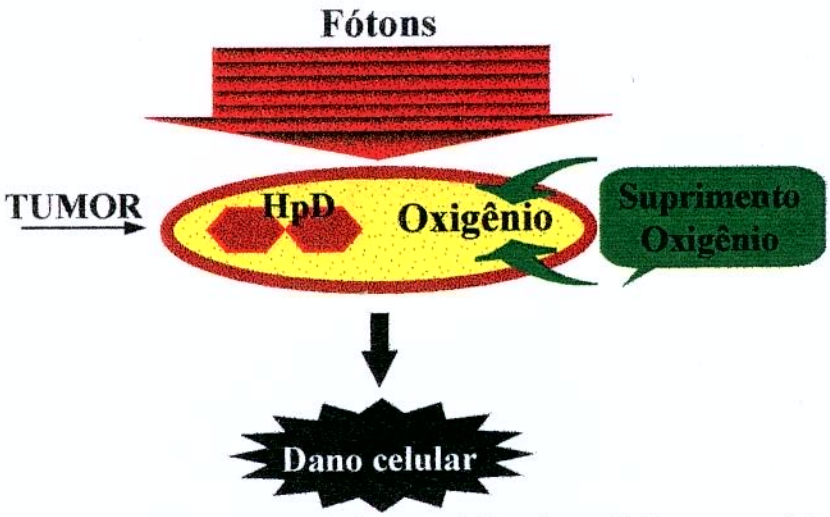


Figura 4.7: Esquema geral do processo de fotossensibilização mediado por um fotossensibilizador associado à Hiperoxigenação hiperbárica.

Em termos práticos, optamos pela *Hiperoxigenação hiperbárica*, onde a câmara é pressurizada diretamente com oxigênio a concentração de 100%. Assim, *além da saturação das hemoglobinas, ter-se-á um aumento considerável na fração de oxigênio dissolvido fisicamente no plasma, e consequentemente, aumento no fornecimento com a disponibilidade de* O_2 *nos tecidos.*

Os detalhes de construção da câmara serão vistos no próximo capítulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO 5

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais.

Para testarmos o modelo proposto na presente tese e representado pela **Equação 4.8**, executamos uma série de experimentos de PDT em condições de hiperoxigenação hiperbárica. O ***quadro*** abaixo resume o material, cujo detalhamento é dado logo a seguir, usado para as experiências com a terapia propriamente dita.

1.1. Fotossensibilizador: Haematoporfirina Ester (HpE).
1.2. Fonte de luz: Laser comercial de HeNe, com potência máxima de 10mW.
1.3. Registro fotográfico: Câmera NIKON, Slide (Asa 100).
1.4. Animais: Ratas Wistar adultas pesando entre 150-200g
1.5. Tumor: Tumor de Walker 256 (W256).
1.6. Câmara hiperbárica: Protótipo com "janelas" ópticas.

1.1. Fotossensibilizador.

O **HpE** (Haematopophyrin Esther) foi comprado da PAISLEY BIOCHEMICAL Ltd-England e recebido na forma diluída em soro fisiológico (V=30ml; C_{HpE}=5mg/ml). A administração do fotossensibilizador foi escolhido a via intravenosa (veia do rabo; $C_{clínica}$=5mg HpE/Kg).

1.2. Fonte de luz.

A irradiação (iluminação) foi feita com um laser de HeNe (HUGHES; modelo 3225H-C) de potência aproximada de 8mW na linha vermelha λ=632,8ηm (***Apêndice C***), com focalização no tumor, propiciando uma Irradiância I_0=10mW/mm^2.

1.3. Registro fotográfico.

Para o registro fotográfico utilizou-se uma câmera NIKON, modelo FM2. com objetiva macro 55mm Slide EKTACHROME (ASA 100).

1.4. Animais de experimentação.

Foram utilizadas no experimento ratas fêmeas albinas *WISTAR*, de criação SPF ("Specific Pathogen Free"), com massa entre 150-200g. Os animais foram trazidos do centro de bioterísmo (CEMIB/UNICAMP) com idade mínima de 7 semanas (adultos), e em seguida, mantidos em condições ambientais normais no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental/UNICAMP. Estes permaneceram em gaiolas especiais de polipropileno, sendo-lhes permitido ração comercial (Labina-PURINA) e água "ad libitum".

1.4.1. Ratos como animais na oncologia.

"Animal perfeito de laboratório ou sistema de teste biológico para pesquisa oncológica não existe". Ratos são utilizados porque: são resistentes, são fáceis de alimentar e guardar, são de tamanho conveniente, são econômicos na manutenção, são bem definidos geneticamente, são dóceis, têm um relativo intervalo de vida curto, têm poucas doenças sérias, têm poucos tumores espontâneos com incidência bem conhecida em várias colorações, são sensíveis a muitos agentes carcinogênicos incluindo utilizados em humanos, e existe vasta informação sobre sua fisiologia, farmacologia e respostas patológicas, publicada na literatura científica ***(Baker 1979)***. Ratos possuem amplo conjunto de neoplasmas, induzidos e espontâneos, comparáveis em morfologia e conduta biológica daqueles observados no homem. O *equivalente de longevidade* do rato para o homem é de **1:30**, ou seja, um experimento de 2,5 anos em rato é equivalente a 75 anos no homem ***(Simms 1967)***. Assim, muitas gerações de ratos podem ser estudadas no mesmo tempo de uma única geração humana.

1.5. Tumor de Walker 256.

O tumor de Walker (W256) é uma neoplasia espontânea de ratos, identificada na mama de uma rata albina prenhe por George Walker, em 1928 ***(Earle 1955)***. O próprio investigador iniciou a manutenção do tumor, implantando-o em mamas de ratas jovens. A partir de então, o tumor tem sido mantido por transplantes sucessivos ou em culturas de células *in vitro*. O **W256** foi transplantado e crescido com a morfologia de um *carcino-sarcoma* exibindo 2 tipos de células com padrões distintos mas morfologicamente similares. Hoje sabe-se, por marcadores imuno-histoquímicos de macrófagos, que as células do **W256** são de origem hematopoiética, ***(Simpkins 1991)***. Simpkins também constatou que a distribuição de células no ciclo celular apresentou **75-80%** das células na fase G_1 do ciclo com o restante nas fases **S** e G_2-**M** do ciclo.

1.5.1. Manutenção da linha tumoral.

A linha tumoral **Walker-256 (W256)** foi gentilmente cedida pelo Dr. Ovídio Rettori (Lab. de Pesq. Bioquímicas- CAISM/UNICAMP). A linha (originalmente obtida da linha Christ Hospital, National Cancer Institute Bank, Cambrige, USA) tem sido mantida em seu laboratório sob N_2 líquido e também através de consecutivas passagens intraperitoneais (i.p.) de $10x10^6$ células ascíticas viáveis. Esta última, permite que as células tumorais se multipliquem num ambiente adequado, onde após aproximadamente 4 dias obtém-se uma amostra de fluxo ascítico suficiente para reinoculação em outro animal.

Tecnicamente coloca-se todo o líquido ascítico retirado do peritôneo do animal "fonte" em um becker (50ml) acomodado inicialmente em banho de gelo. Em seguida, acrescenta-se o dobro do volume retirado com solução salina (0,9%). A manutenção é feita pela injeção intraperitoneal de 0,25ml do volume da solução resultante (1:2) no animal "destino".

1.5.2. Obtenção de modelos tumorais sólidos.

O animal receptor é imobilizado em decúbito ventral com *tricotomia dorso-lombar* e mantido em plano anestésico pela inalação constante de éter etílico. Cada animal recebeu 4 inoculações subcutâneas (s.c.) simultâneas (com $10x10^6$ células viáveis/sítio; V=0,25ml - mesma solução utilizada para a manutenção), em sítios emparelhados com a linha média, no mínimo 1cm distantes. Este procedimento proporcionou um rápido crescimento de um tumor sólido em cada sítio com características adequadas para nosso experimento PDT. A injeção subcutânea foi facilitada pelo uso de seringa e agulhas de insulina (seringa: tuberculina-1ml e agulhas: 13x4,5 - 26 G½).

1.5.3. Padronização dos efeitos sistêmicos.

A técnica da *inoculação multifocal* (4 inoculações s.c. simultâneas), foi desenvolvida pelo Dr. Rettori afim de permitir a sincronização dos animais acometidos com as células do **W256.** Este procedimento permitiu uma homogeneidade no desenvolvimento dos tumores desde o "disparo", dado pelo *dia inoculação* (D=0), até o *óbito*(***Rettori 1995***).

O Walker 256 é caracterizado pelo seu *crescimento rápido*, por ser *altamente vascularizado*, *muito invasivo com metastização precoce via linfática*. Este tipo de tumor tem sido um bom modelo para estudar resistência à droga, disseminação de metastases e estados fisiopatológicos do câncer (***Rettori 1996***). Contudo o sítio de instalação do W256, após metástase, depende da via de inoculação utilizada. Estudos mostram que *inoculação intramuscular* do W256 favorece o estudo de *alterações miocardicas dependentes de fenômenos microvasculares* (***Ramos 1993***). *Inoculação através da traquéia* dos animais favorece ao *estudo de metastases em nódulos linfáticos torácicos e linfagite carcinomatosa*, onde observou-se neste mesmo estudo, invasão do W256 nos pulmões dos animais (***Soares 1993***).

1.6. Câmara hiperbárica.

A inexistência na UNICAMP de uma câmara hiperbárica apropriada para experiências com iluminação externa por laser nos obrigou a projetar e construir tal equipamento. A câmara foi construída nas dependências do GDAL (**G**rupo de **D**esenvolvimento e **A**plicações **L**aser do Dep. Estado Sólido - Instituto de Física "Gleb Wataghin"/UNICAMP). Os testes de segurança e vazamento da câmara foram realizados no **C**entro de **T**ecnologia (**CT**/UNICAMP). A **Figura 5.1** mostra o projeto detalhado da câmara construída.

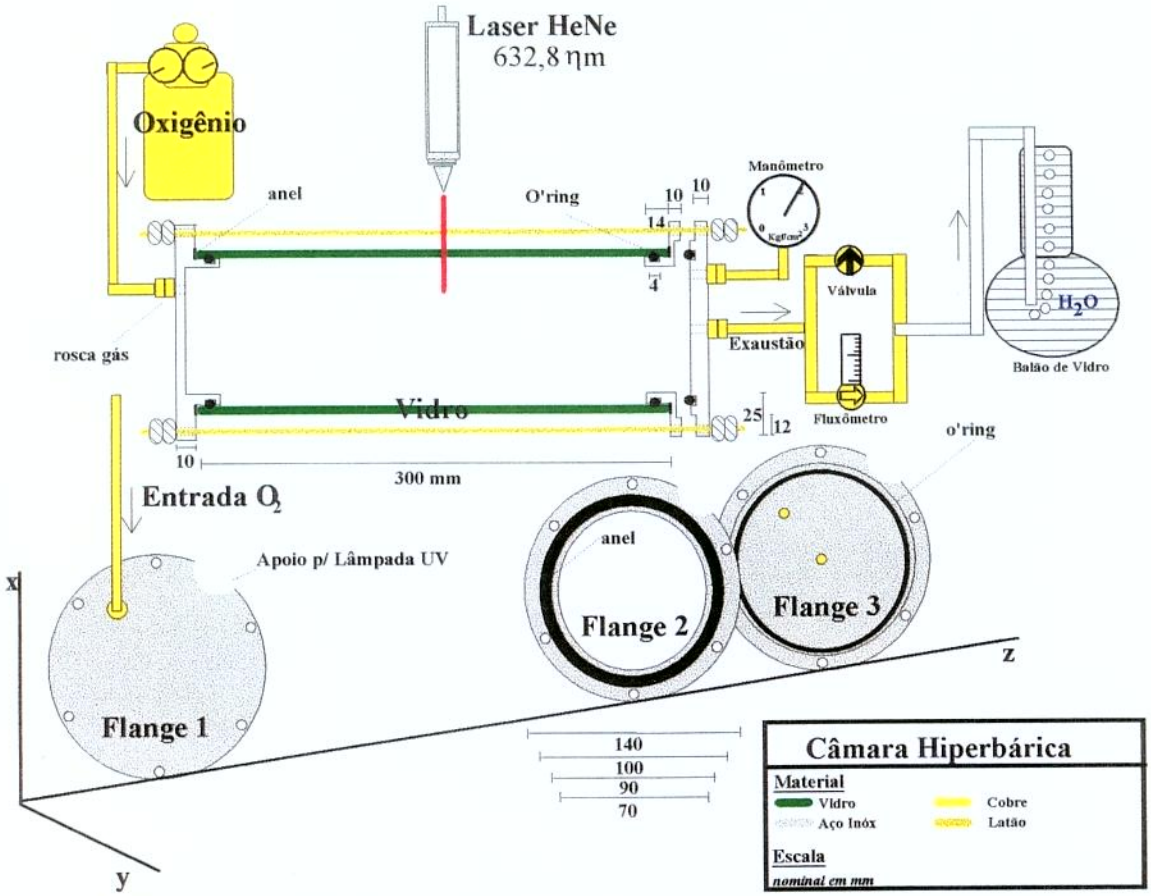


Figura 5.1: Projeto da câmara hiperbárica experimental.

A câmara constitui-se de um *tubo de vidro* transparente *temperado* (SCHOTT: com diâmetro externo=100mm, comprimento=300mm e espessura do vidro=5mm) posicionado entre *3 flanges de aço inóx*. As flanges foram desenhadas de tal forma a possibilitar uma perfeita acomodação do vidro nos "o'rings", *posicionados estrategicamente*, afim de evitar vazamento de oxigênio quando a câmara é pressurizada. A câmara possui um volume aproximado V≅2,5litros.

Brevemente temos que a *Flange 1* é responsável pelo apoio do vidro, e entrada do fluxo de oxigênio. A *Flange 2*, serve para apoio do vidro e "batente" para a introdução do animal no interior da câmara. A *Flange 3* é utilizada como porta e conecção do MANÔMETRO que marca a pressão no interior da câmara (com fundo de escala 3Kgf/cm^2 - *limite de segurança* do vidro SCHOTT). Um *Fluxômetro* regula a exaustão do gás no interior da câmara, que é monitorado visualmente pelas bolhas no final do circuito. A leitura da pressão é feita diretamente no manômetro. A **Figura 5.2** abaixo mostra a câmara experimental construída.

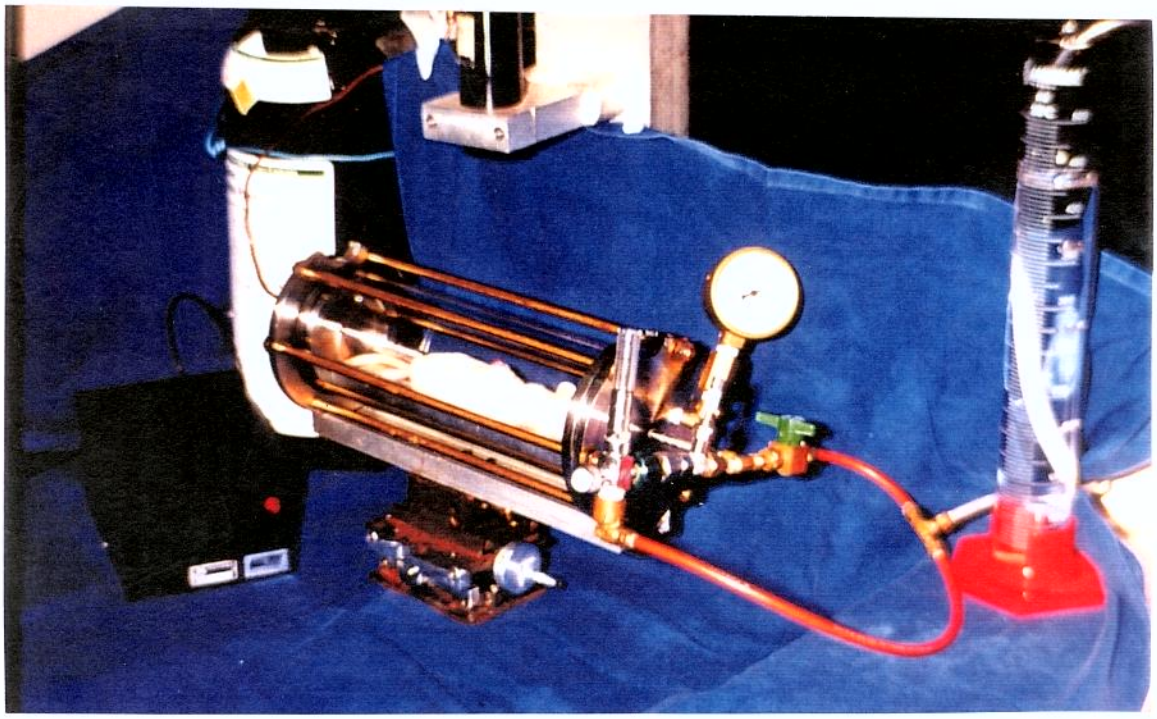


Figura 5.2: Visão panorâmica da câmara hiperbárica experimental.

1.7. Fluorescência.

O *primeiro trabalho* que utilizou o Tumor **W256** para avaliação em estudos de retenção e seletividade da hematoporfirina, data de 1960 ***(Winkelman 1960).*** Este único estudo que encontramos na literatura não dá subsídios para considerar o referido como modelo experimental com PDT, entretanto para o presente trabalho o Walker 256 mostrou-se muito prático por diferentes razões. Em primeiro lugar pela sua disponibilidade em nossa Universidade, tornando possível o trabalho experimental imediato e, em segundo lugar, pela sua própria natureza de evolução rápida em ratos, permitindo conclusões em poucos dias de observação. Por esta razão, antes de tratarmos o referido tumor com PDT, tivemos o cuidado de verificar se a droga escolhida como fotossensibilizadora era retida pelo tumor como em outros casos conhecidos. Para tal, analisamos a fluorescência induzida por iluminação UV (lâmpada comercial Phillips BLB-20W) através da montagem experimental esquematizada na **Figura 5.3**.

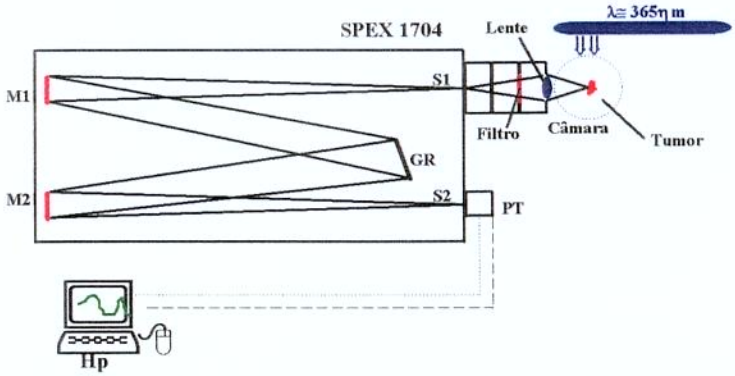


Figura 5.3: Desenho esquemático da montagem experimental utilizada na análise da fluorescência. O cromóforo é excitado com luz UV (λ≅365ηm)e a fluorescência analisada por um espectrômetro (SPEX1704), detectada por uma fotomultiplicadora (PT). O registro do espectro foi feito através de uma registradora (Hp). S1, S2 são fendas; M1, M2 são espelhos e GR é a rede do espectrômetro.

Como a fluorescência do Walker 256 apresentou-se muito intensa, também foi possível o registro fotográfico através de sistema convencional de fotografia colorida.

2. Métodos.

2.1. Padronização da evolução tumoral do Walker 256.

Afim de obtermos um bom *controle* experimental, um fator importante a ser considerado é, no mínimo, a semelhança entre os tumores dos diversos grupos em questão.

A técnica da *inoculação subcutânea multifocal dorsal*, permitiu sincronizarmos a evolução tumoral, iniciada pelo dia da inoculação (D=0). Assim, todos os animais desenvolveram tumores macroscópicos no sítio da inoculação. A "pega" do tumor pode ser percebida após o segundo dia da inoculação (D=2). Entre o sexto e oitavo dia, todos os animais apresentaram massa tumoral parcialmente uniforme **(Figura 5.4)**, sendo possível sempre a escolha de um tumor em condições adequadas para o tratamento experimental e para posterior análise. Por esta técnica, animais controle, vão a óbito espontaneamente entre 13°-14° dia após inoculação.

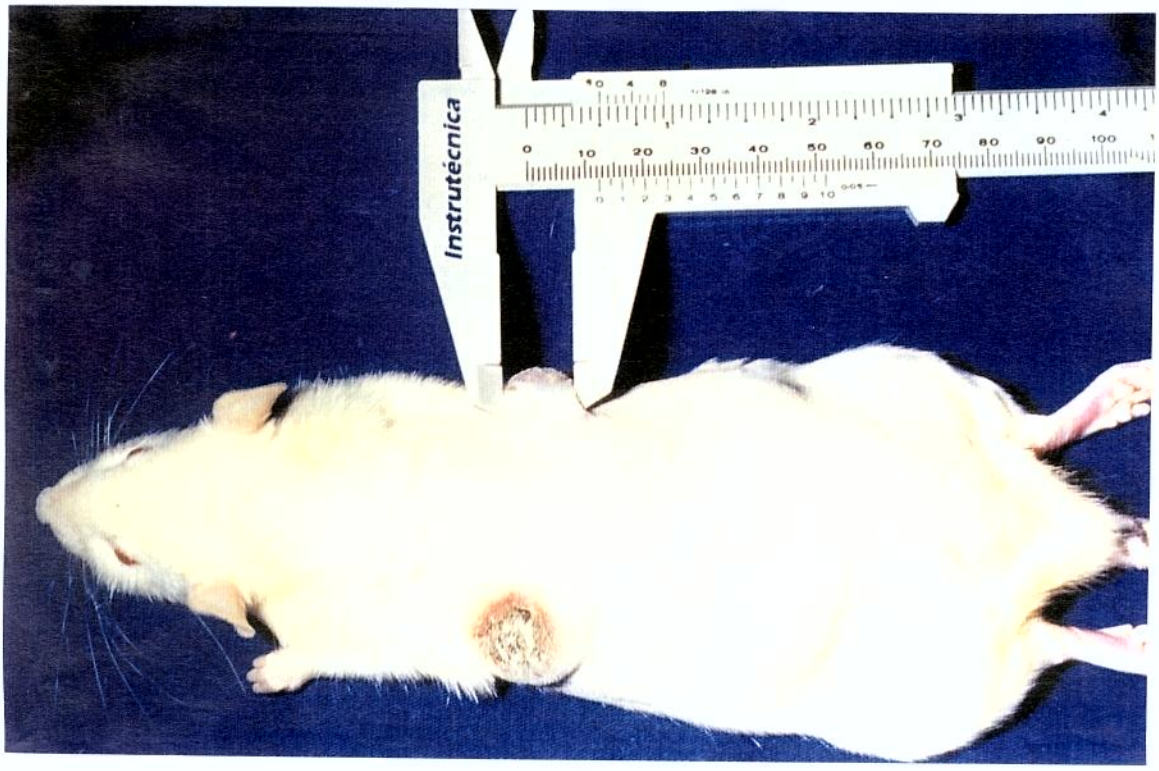


Figura 5.4: Rato acometido com tumor, 7 dias após a inoculação subcutânea multifocal. Mostramos em destaque o tumor escolhido para o tratamento

2.2. Terapia fotodinâmica em hiperoxigenação hiperbárica.

Após *uma semana* do crescimento tumoral, os animais acometidos com tumor receberam uma injeção de **HpE**, via veia do rabo (butterfly-25G), e separados em local escuro até o tratamento. Após 24 horas da injeção de **HpE**, inicialmente o animal foi anestesiado com *Pentobarbital Sódico* (5mg/100g) para manutenção de um plano anestésico prolongado. O tumor foi escolhido de acordo com a *homogeneidade, volume, posição e condições de integridade*, e em seguida, foi depilada sua pele superior. Parte deste tumor foi irradiado com laser durante 45 minutos.

Para o *protocolo experimental* (câmara aberta ou fechada), o animal foi posicionado no interior da câmara de modo que o feixe laser incida normalmente sobre o tumor a ser tratado. Para o experimento com HBO, a câmara foi fechada e mantida sob *ventilação* constante para garantir um ambiente saturado de O_2 (WHITE & MARTINS: 97% puro) antes da compressão.

A *compressão* consiste na lenta elevação da pressão no interior da câmara, sendo esta monitorada constantemente no manômetro. Isto foi feito mantendo uma exaustão levemente inferior ao fluxo de entrada de oxigênio. A subida lenta da pressão, garante que o animal tenha tempo de *"equalizar"* suas pressões externa com a interna. Esta manobra evita o *'barotrauma do ouvido médio'*. Uma de "subida" em torno de *1atm a cada 5 min* foi suficiente para garantir um bom procedimento. A *estabilização* consiste em manter a pressão constante no interior da câmara, ou seja, o fluxo de entrada de oxigênio é igual à exaustão do ar no interior da câmara (½ litro/min.). Geralmente este estado é mantido pela regulagem constante do fluxômetro e não ultrapassou o tempo de 45 minutos. *É nesta fase de estabilização que foi realizado o Tratamento Fotodinâmico propriamente dito.* A *descompressão* consiste na descida lenta da pressão no interior da câmara. Isto foi feito procedendo-se inversamente à compressão. A descida lenta é necessária para *evitar 'doenças descompressivas'*.

Após o precedimento completo, o animal foi retirado da câmara (ainda anestesiado) e acomodado nas gaiolas de polipropileno para recuperação, em ambiente escuro, recebendo água e ração "ad libitum". A **Figura 5.5** mostra a representação esquemática do protocolo seguido. Os animais foram sacrificados aproximadamente 24 horas após a PDT, para análise histológica do tumor.

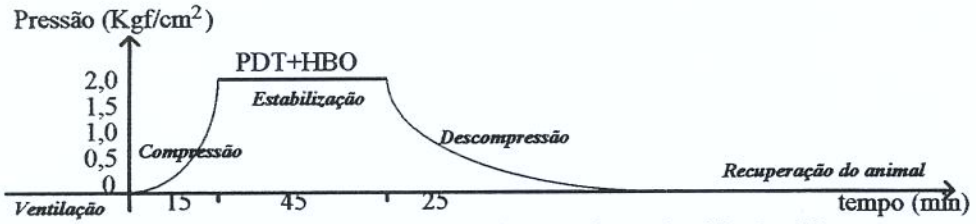


Figura 5.5: Representação esquemática do protocolo experimental utilizado. Neste caso, a pressão é relativa à 1atm, assim o ponto zero corresponde a pressão normal (câmara aberta).

A **Figura 5.6** abaixo mostra um animal durante o tratamento PDT+HBO.

Figura 5.6: Animal sendo submetido ao tratamento PDT+HBO. O laser utilizado é de Hélio-Neônio ($P \cong 8mW$, $\lambda = 632,8\eta m$).

2.3. Histologia.

Após sacrifício do animal, a periferia da área irradiada do tumor foi marcada com quatro alfinetes. Um fragmento de cerca de *1,0 x 0,8 x 0,4 cm* foi retirado e fixado em *formaldeido 4%* por 24 horas, e depois desidratado em álcoois de concentração crescente, diafanisados em *Xilol* e incluídos em parafina. Cortes seriados (de 5μm de espessura) foram realizados, paralelos ao eixo central da zona previamente irradiada (com a orientação dos canais criados pelos alfinetes). Os cortes foram montados em lâmina de vidro (KNITTEL 76x26mm), corados com hematoxilina, eosina e incluídos em *Entellam*. Estas lâminas histológicas foram analisadas no Departamento de Anatomia Patológica/UNICAMP, sendo identificadas as regiões do tecido em *Área tratada, Tumor (controle), Necrose espontânea* para posterior análise de fragmentação de DNA.

2.4. Extração de DNA e eletroforese em gel de agarose.

Uma pequena amostra do tecido que restou no bloco de parafina (*tratado, controle, Necrose espontânea)*, foi colocado em tubos *Eppendorff* contendo 50μl de tampão de digestão (50mM de tris-HCl pH 8,5; 1mM de EDTA; e 5% de Tween 20). O material foi triturado, vedado em parafilme, e submetido a 90 segundos em forno microondas (6 x 15seg) à potência de 500 Watts. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 r.p.m. A digestão proteolítica foi feita com proteinase K (V=1,25μl, 20μg/μl), a 42°C, "overnight". No dia seguinte, adicionou-se, 1μl de RNAse (1mg/ml) permanecendo apenas DNA na solução. 5μl desta solução foram misturados a 2μl de azul de bromofenol e submetida à eletroforese em gel de agarose (80 Volts) 1,5% com brometo de etídio (1mg/ml), até o marcador migrar 4-5 cm (aproximadamente 3 horas). Uma vez que a molécula do brometo de etídio tem a propriedade de se intercalar na fita dupla de DNA este pode ser visualizado devido a fluorescência por excitação ultravioleta e fotografado.

Um padrão de peso molecular, contendo fragmentos de 100 a 1500 pares de base, em múltiplos de 100, foi adicionado ao lado do gel para servir de referência para a análise da distribuição dos fragmentos apoptóticos. A técnica de extração do material genético do mesmo tecido identificado na lâmina histológica foi realizado no Departamento de Genética Médica/UNICAMP.

RESULTADOS, TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS E DISCUSSÕES

CAPÍTULO 6

RESULTADOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

1. Diagnóstico por fluorescência.

O arranjo da **Figura 5.3** permitiu inicialmente que fosse feito um levantamento espectral da lâmpada de UV comercial utilizada para produzir a fluorescência dos tecidos em estudo, conforme explicado no capítulo anterior. A **Figura 6.1** mostra que tal lâmpada, que é de alta pressão, emite uma banda centrada em 350ηm, apresentando também os picos bem definidos e característicos do Mercúrio (Hg) em 366ηm e o Dubleto 578ηm (376,9ηm - 379,0ηm).

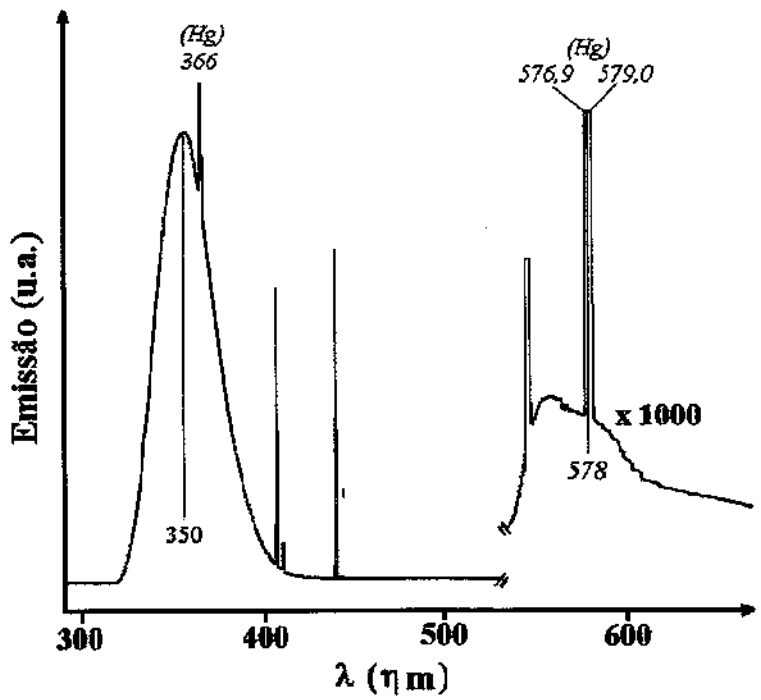


Figura 6.1: Espectro de emissão da lâmpada UV. A banda de emissão é centrada em 350ηm. As transições atômicas do mercúrio (Hg) são utilizadas como referenciais espectroscópicos.

Após 24 horas da injeção do **HpE**, registramos o espectro de fluorescência de tecidos cancerosos, e de tecidos normais de alguns animais de experimentação para garantirmos que o fotossensibilizador encontrava-se preferencialmente no tumor a ser tratado. O espectro obtido, e apresentado na **Figura 6.2**, é típico para tumores de Walker 256 de nossa experiência onde a banda de emissão centrada em 626,8ηm corresponde ao fotossensibilizador utilizado. Na mesma figura podemos notar uma banda ente 550-600ηm que sob o Dubleto 578ηm da lâmpada de Hg, que por ser relativamente intenso, reflete-se pelo tecido atingindo o espectrômetro com intensidade comparativamente alta. A reflexão do Dubleto 578ηm foi utilizada para calibrar o espectrômetro. Medidas em tecido normal dos mesmos animais não mostraram a banda correspondente ao fotossensibilizador.

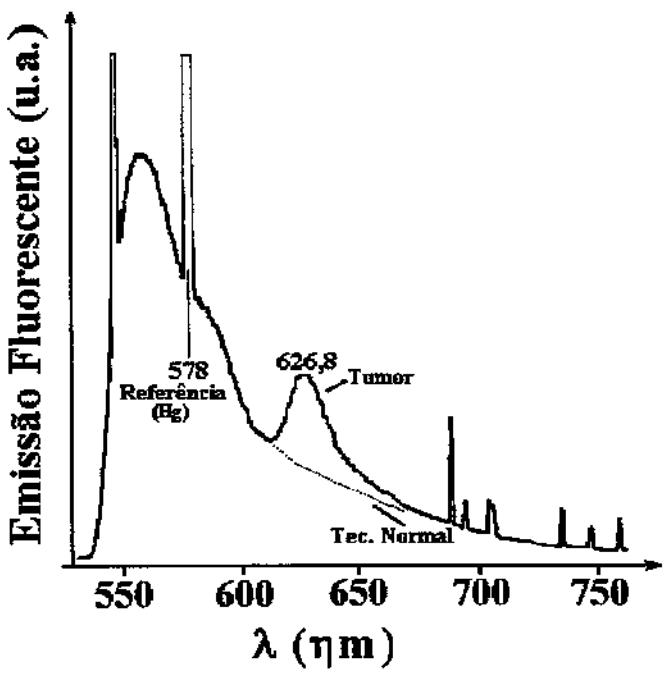


Figura 6.2: Espectro de emissão fluorescente do HpE retido no tumor de Walker 256. O pico 626,8ηm representa a fluorescência induzida no W256 devido a retenção do HpE no tecido tumoral após 24h da injeção da droga. Tecidos normais como músculo, pulmão, fígado e rins etc... não apresentaram fluorescência.

1.2. Distribuição fluorescente no tecido normal e tumoral.

O acompanhamento do trânsito do fotossensibilizador, desde a sua administração até sua eliminação em um animal acometido com tumor é de grande interesse. A via utilizada para injeção do HpE (C=10mg/kg de peso) foi intravenosa. Para cada observação, associamos um número relativo à fluorescência (*Nada=0, Pouca=1, Média=2, Muita=3* e etc). Isto facilitou a *visualização do perfil da distribuição do HpE* nos animais experimentais nos períodos de interesse clínico. A excitação óptica, das moléculas, foi feita através da *Banda UV* mostrada na **Figura 6.1** e a fluorescência observada diretamente, a olho nú e registrada fotograficamente em local escuro. O experimento foi realizado em *duas etapas*, como descreveremos à seguir:

A primeira etapa, constituiu em fazermos as observações necessárias em *"tempo real"*, ou seja, observamos o animal, em plano anestésico, com as vísceras expostas, por um período de aproximadamente 2 horas após injeção do HpD. O resultado pode ser visualizado na **Figura 6.3.**

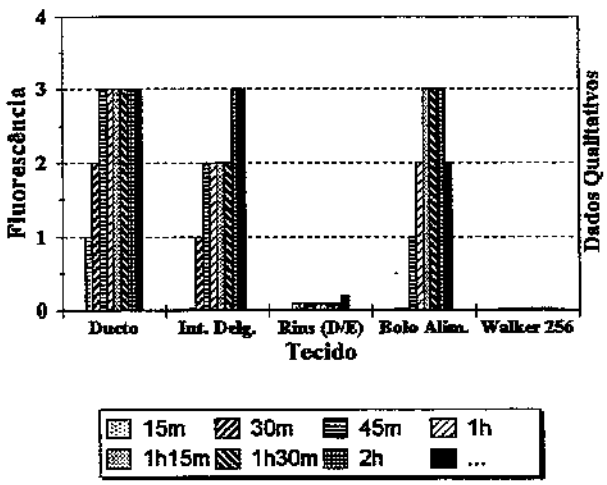


Figura 6.3: *Distribuição fluorescente do HpE.* Processo dinâmico.

Após 5 minutos da administração do fotossensibilizador, observou-se alguma florescência no ducto pancreático, ducto biliar e veia porta hepática. *Após 30 minutos*, a fluorescência, com intensidade aumentada, atinge a alça do "intestino delgado" pelo ducto pancreático, e *aos 40 minutos*, esta também começa a fluorescer na região proximal ao estômago. No decorrer do tempo, até o final desta primeira fase, notamos que a alça do intestino como um todo reteve o HpD, desde o ducto pancreático até o cécum. Até o final das 2 horas, a região do "intestino grosso" (cécum até o reto), não apresentaram fluorescência.

Na *segunda etapa*, injetamos o HpE (C=10mg/kg) em 48 animais e *após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 48 horas*, em 3 animais de cada grupo foi feita uma necrópsia com a observação local da fluorescência. O resultado pode ser visualizado na **Figura 6.4.**

Após *3 horas* foi observada fluorescência em tecidos do estômago, intestino e rins (Esquerdo e Direito). *Com Δt=24h*, uma acentuada fluorescência foi observada somente no tecido tumoral (dorsal e metastases nos nódulos principalmente nos ilíacos e mesentéricos). *Após Δt =48h*, pouca fluorescência foi observada a olho nú nestas mesmas regiões.

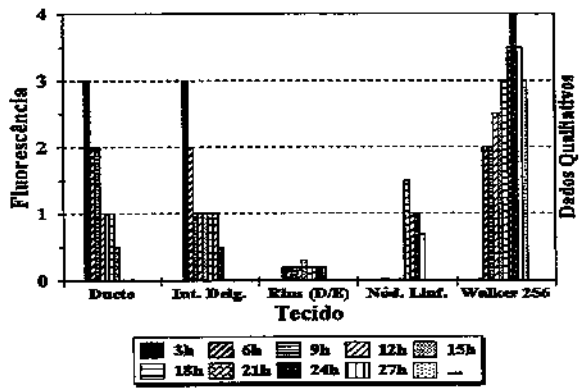


Figura 6.4: *Distribuição fluorescente do HpE.* Processo estático.

Na **Figura 6.4** acima, observamos claramente que o fotossensibilizador é eliminado do tecido normal e em contrapartida, retido no tecido.

Na **Figura 6.5** observamos o registro fotográfico do corte do tumor, sob excitação flash e UV-350ηm. Podemos observar nitidamente as várias regiões com fluorescência, significando alta retenção do fotossensibilizador diferentemente do tecido normal (sem fluorescência). Estes resultados obtidos aqui, de uma forma qualitativa, concordam com estudos feitos anteriormente em ratos utilizando *HpD (marcada) ***(*Bugelski 1981, Henderson 1992*)**.

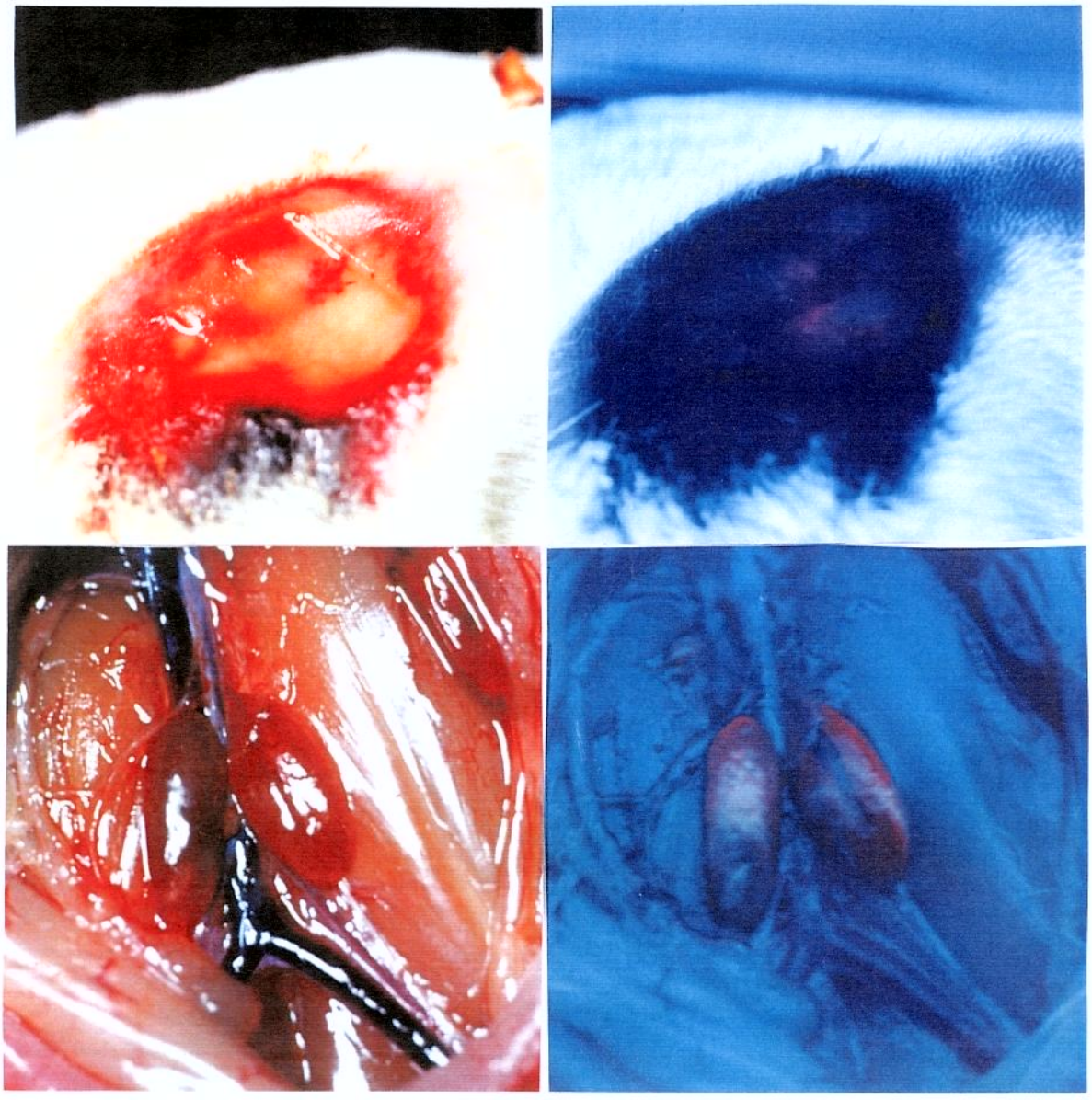


Figura 6.5: Registro fotográfico da fluorescência. À esquerda: tecidos excitados com flash. À direita: mesma situação excitada com UV. Em cima: Corte sagital do tumor de Walker 256. Em baixo: Os nódulos linfáticos ilíacos.

2. Tratamento via terapia fotodinâmica em condições hiperbáricas.

A região tratada recebeu uma $Dose_{Total}$ de energia luminosa de $\cong 21 J/mm^2$, utilizando a linha vermelha de um laser de HeNe ***(Dougehrty 1976)***. O tumor foi irradiado diretamente com 8mW de potência - medida após atravessar o vidro (SPECTRA-PHYSICS modelo 407A) - durante 45 minutos, seguindo o seguinte protocolo:

Grupo 1: Tumores tratados com PDT em condições normais, câmara aberta (1 atm) após 24 horas de injeção i.v. de HpE. Total 10 animais.

Grupo 2: Tumores tratados com PDT em condições de hiperoxigenação hiperbárica a 2 atm, após 24 horas de injeção i.v. de HpE. Total 10 animais.

Grupo 3: Tumores tratados com PDT em condições de hiperoxigenação hiperbárica a 3 atm, após 24 horas de injeção i.v. de HpE. Total 10 animais.

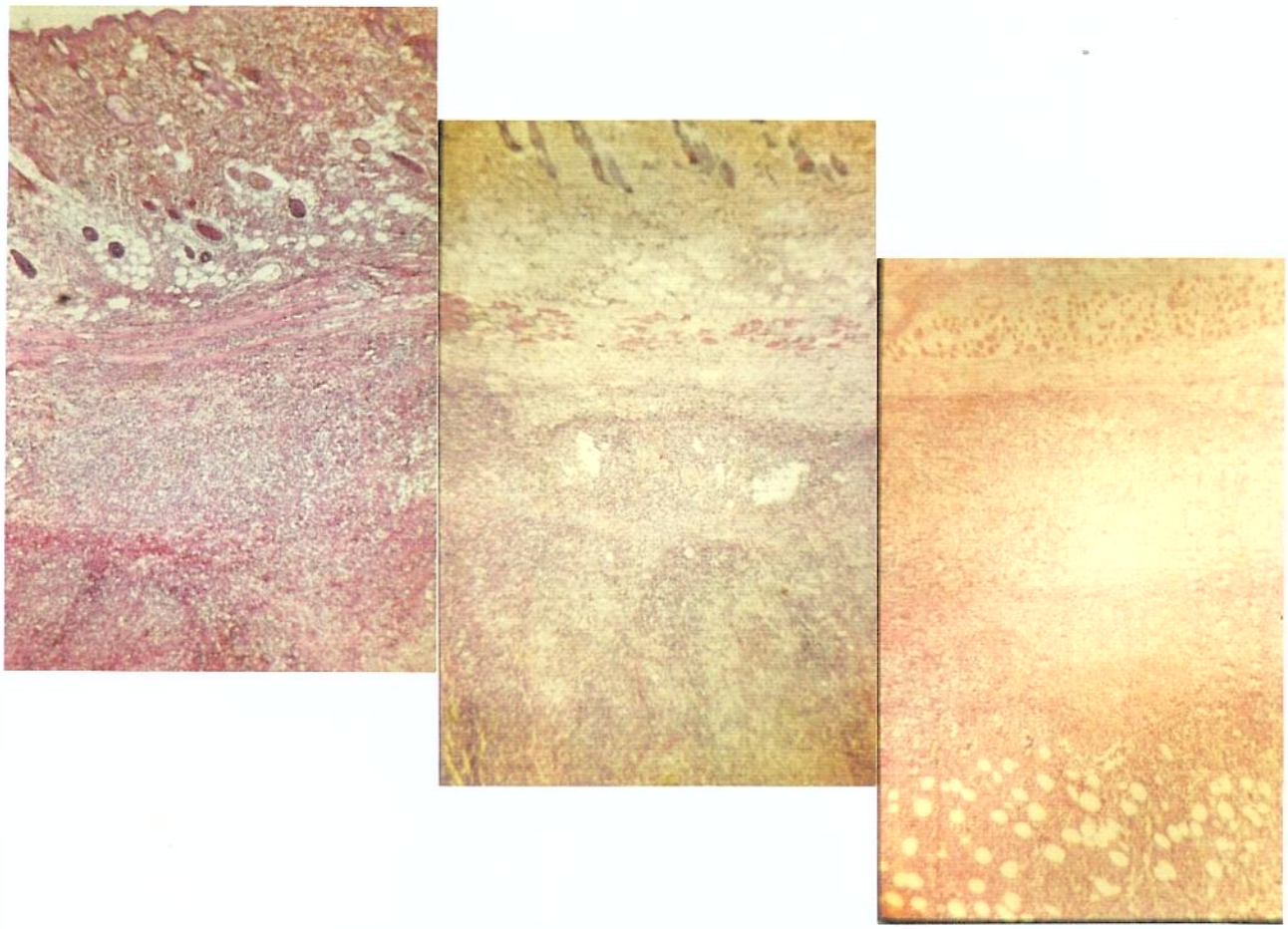
Grupo 4: Controle. Tumores tratados com Laser, sem HpE, em condições de hiperoxigenação hiperbárica a 3 atm. Total 10 animais.

Grupo 5: Controle. Tecidos normais tratados com laser em condições de hiperoxigenação hiperbárica a 3 atm. Total 10 animais.

Após a retirada do animal da câmara, o ponto de aplicação do laser no tumor foi demarcado para futuro alinhamento dos alfinetes que guiaram o corte histológico.

2.1. Análise histológica.

Após 24 horas do tratamento, os animais foram anestesiados, em cuba saturada com éter etílico. O tumor tratado foi cortado em seções verticais paralelas aos 2 alfinetes previamente alinhados com o ponto de aplicação do laser, de modo que o "cone" de penetração luminosa estivesse no mesmo plano dos 2 furos deixados pelos alfinetes incluídos parafina. A **Figura 6.6** mostra a seção vertical do tumor W256 submetido a estas condições. Em seguida a este procedimento, os animais foram sacrificados.



Não tratado (controle) **1 atm** **3 atm**

Figura 6.6: *Corte histológico vertical do tumor*. No *corte controle* (não tratado) observamos, de cima para baixo, a *epiderme*, uma *camada muscular* e logo abaixo o *tumor propriamente dito*. O tumor tratado em 3 atm mostra uma redução drástica na densidade de células viáveis e também uma maior penetração de tratamento quando comparado com o tumor tratado com 1 atm. As fotografias foram niveladas utilizando a camada muscular como referência. Ampliação (5x1.6).

As fotografias acima foram centralizadas, pelo patologista, na região de maior interesse. O alinhamento das fotos com a camada muscular (referência) foi necessário para que tivéssemos um bom padrão de comparação entre as lâminas. As regiões das lâminas foram setorizadas como *'área tratada'*, *'tumor viável'*, e *'necrose espontânea'*.

A **Figura 6.7** mostra uma ampliação do exame histológico para 3 atm, onde na ampliação da *área tratada* (**B**) podemos observar a presença de vários *corpúsculos apoptóticos (setas)*. Na área *controle* (**C**) do mesmo tumor (região não atingida pela luz laser), não foram encontrados sinais significativos de morte celular.

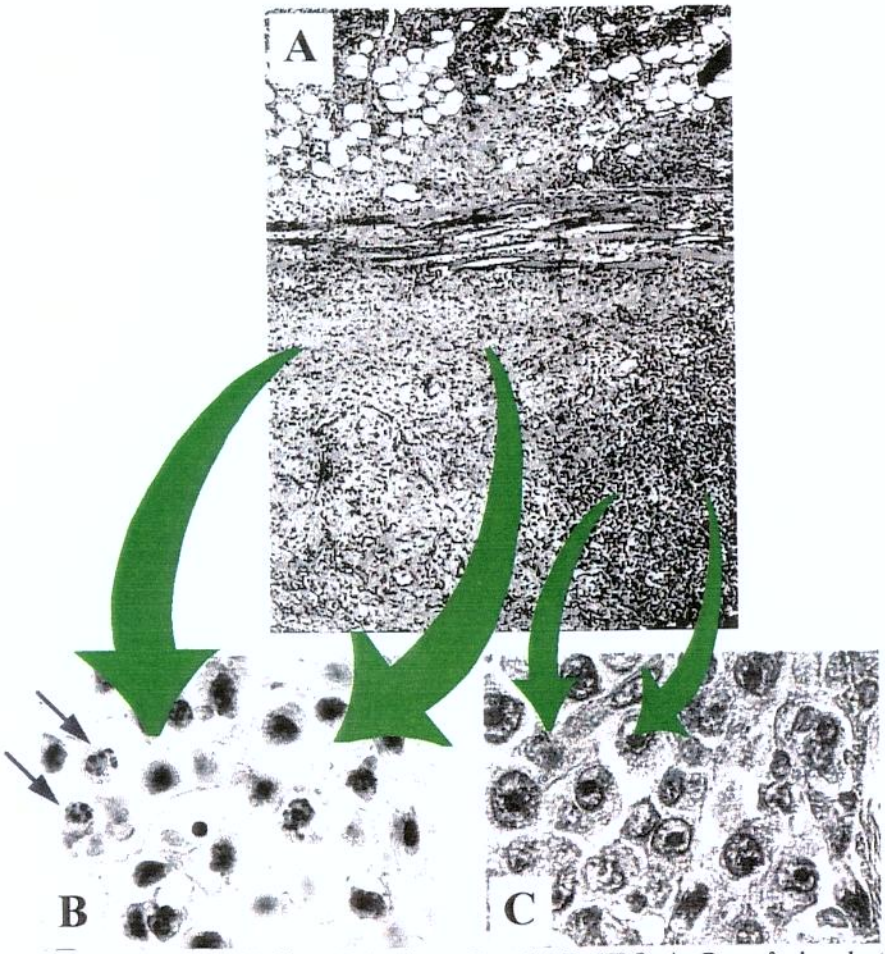


Figura 6.7: *Exame histológico do Walker 256 submetido a PDT+HBO.* **A:** Panorâmica do tratamento. **B:** Ampliação da área tratada, mostrando corpúsculos apoptóticos. **C:** área controle, células características do W256. Ampliação áreas B e C (40x1.25).

Na **Figura 6.7.B**, observamos sob o ponto de aplicação do laser a *região do tumor tratada, caracterizada* . Na **Figura 6.7.C**, mostramos o controle, *mesmo tumor* mas área não exposta ao laser, este procedimento facilitou análise posterior.

Na área tratada encontramos um "canal", que aparece no menor aumento com área mais pálida e bem delimitada. Esta zona é caracterizada por um intensa redução do número de células neoplásicas, com presença de necrose celular, apoptose nuclear e edema. Encontramos também vesículas e centróides com recuo da parede e/ou oclusão trombótica.

Com relação aos grupos controle, a *histologia* do **Grupo 5** mostrou que *somente a ação do Laser de HeNe sobre o tecido normal não causou dano*. Nas regiões laterais a incidência da luz preservaram todas as suas características naturais intactas. Estes resultados descartam a possibilidade de danos referentes à hiperoxigenação hiperbárica e/ou *ação Hipertérmica* do laser de HeNe. A *histologia* do **Grupo 4**, mostrou que a *depilação* realizada sobre a área de aplicação do laser no tumor *não altera a pele quanto a inflamação*, ou necrose, preservando por completo a estrutura da epiderme e tumor o subcutâneo. Mostrou também que na área da irradiação *não houve alteração nos vasos ou na musculatura.* Estes resultados nos mostram que o tumor não é afetado pela ação do **HpE** em conjunto com a hiperoxigenação hiperbárica, *descartando efeitos de Oxi-redução*.

2.2. Extração de DNA e eletroforese em gel de agarose.

Na eletroforese, o DNA normal, integro, possui um peso molecular característico, o DNA das células apoptóticas tem a característica de ser cortado em fragmentos de 180 pares de base (tamanho oligonucleossômico) ou múltiplos deste número, apresentando, deste modo, um padrão de "escada". Já o DNA de células necrosadas aparece sob a forma de um "rastro", já que este DNA está completamente degradado.

A **Figura 6.8**, mostra a eletroforese das regiões consideradas de relevância:

Apoptose, representa amostra da área tratada. Nesta área observa-se claramente a fragmentação do DNA em *múltiplos de 180-190 par de bases*, observamos também sinais de necrose induzida pela PDT (fragmentação aleatória).

Necrose, representa amostra de necrose espontânea do tumor. Esta região é caracterizada pelo padrão "randômico" da fragmentação do DNA ("rastro").

Tumor, representa amostra do tumor propriamente dito. Nesta região praticamente não há fragmentação do DNA.

Padrão, mostra marcador de peso molecular de 100 par de bases.

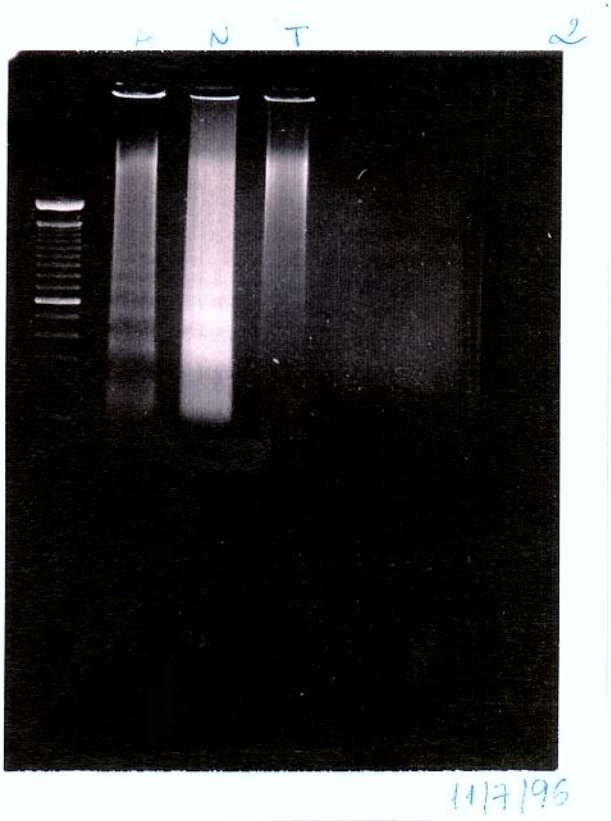


Figura 6.8: Eletroforese do DNA de algumas regiões específicas do tumor tratado. O DNA foi isolado e sujeito a eletroforese em agarose a 1,5% até o marcador migrar 4-5cm.

O DNA, por ser negativamente carregado, devido aos seus grupamentos fosfato, migra para o polo positivo da cuba de eletroforese e, com isto, os fragmentos de menor peso molecular migram com uma velocidade maior, ficando na porção inferior do gel.

3. Tratamento estatístico.

"A teoria de probabilidades nada mais é do que o bom senso transformado em cálculo ***(Pierre Simon Laplace)****"*.

3.1. Introdução.

Num sistema biológico, *as médias das contagens feitas em amostras tendem a se distribuir segundo uma curva gaussiana (ou normal)*. Esta distribuição é totalmente determinada pela *média* (μ) e o desvio *padrão* (σ). O resultado de um experimento, *que mostra alguma diferença significativa*, são caracterizados por pertencerem aos extremos desta curva, com *probabilidade de ocorrência baixa* em condições normais *(probabilidade ≤ 5%)*.

Apresentamos neste capítulo uma análise estatística objetiva dos nossos resultados, utilizando como ferramenta o programa WinStat. Nosso objetivo foi demonstrar que os resultados obtidos em *Hiperoxigenação Hiperbárica diferem significativamente dos resultados obtidos em Condições Normais (Ar)*.

3.2. Parametrização.

A **Figura 6.9** mostra uma esquematização do cone do tecido tratado por um feixe laser com distribuição Gaussiana de intensidade. Os parâmetros "B", "b" e "h" auxiliam na discussão do observado na análise com microscopia óptica.

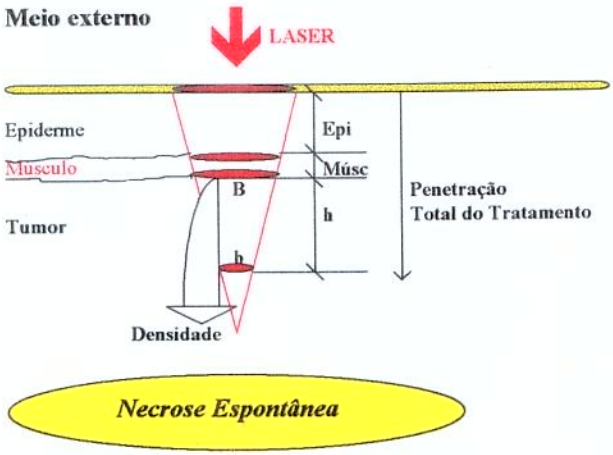


Figura 6.9: Esquema simplificado da região tratada do tumor.

3.3. Resultados quantitativos.

A **Tabela 6.1** mostra os resultados experimentais para os grupos representativos **(G1 e G3)**, como estabelecido em capítulos anteriores.

	Grpo (atm)	Massa (g)	Idad (dias)	Pen (mm)	Epi (mm)	Músc (mm)	TWin (hora)	TSac (hora)	Densi (célula)	h (mm)	B (mm)	b (mm)	Vtrn (mm^3)
1	1	182	9.00	2.73	1.15	0.45	24.50	24.00	60.00	1.13	0.63	0.63	0.35
2	1	183	9.00	1.90	1.18	0.45	27.25	24.00	70.00	0.28	0.50	0.50	0.05
3	1	154	7.00	1.50	0.78	0.23	25.00	28.75	20.00	0.50	1.63	1.75	1.12
4	1	184	7.00	1.60	0.75	0.18	25.00	29.50	24.00	0.68	3.00	2.50	4.02
5	1	154	6.00	1.75	0.88	0.38	23.50	23.75	7.00	0.50	1.75	1.38	0.96
6	1	134	6.00	1.25	0.75	0.25	23.50	23.50	8.00	0.25	0.88	0.75	0.13
7	1	166	6.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	1	136	6.00	2.13	0.90	0.40	25.00	22.00	25.00	0.83	0.75	0.75	0.36
9	1	137	6.00	1.28	0.75	0.25	27.00	20.00	68.00	0.28	1.00	1.00	0.22
10	1	152	6.00	1.28	0.60	0.28	28.00	19.00	63.00	0.40	1.25	0.38	0.23
11	3	185	7.00	2.65	1.20	0.28	25.00	27.00	38.00	1.18	1.63	0.38	1.04
12	3	200	7.00	2.40	0.85	0.23	27.00	24.25	0.00	1.33	2.00	1.13	2.61
13	3	207	7.00	2.25	0.60	0.28	29.00	23.00	0.00	1.38	2.13	0.50	2.10
14	3	160	5.00	2.35	0.75	0.23	25.75	27.00	26.00	1.38	1.50	1.00	1.71
15	3	145	5.00	1.75	0.75	0.25	27.00	26.00	0.00	0.75	2.75	2.75	4.45
16	3	165	5.00	1.75	0.75	0.25	29.00	22.00	4.00	0.75	1.63	1.88	1.81
17	3	185	7.00	1.93	0.70	0.35	24.00	24.00	47.00	0.88	2.50	1.25	2.51
18	3	188	8.00	3.35	1.13	0.25	28.00	24.00	0.00	1.98	2.13	1.50	5.15
19	3	175	7.00	2.88	0.88	0.50	23.50	26.00	27.00	1.50	1.25	1.00	1.50
20	3	172	7.00	2.75	0.83	0.35	24.50	25.00	20.00	1.58	1.75	1.50	3.27

Tabela 6.1: Dados experimentais obtidos pela morfometria.

Definição das variáveis:

Grpo = descrição do grupo em **atm.**
Massa = Massa do animal em **gramas.**
Idad = Idade do tumor **em dias.**
Pen = Penetração total do tratamento **em milímetros.**
Epi = Comprimento da camada epitelial **em milímetros.**
TWin = Tempo após injeção de HpE **em horas.**
Músc = Espessura da camada muscular tomada como referência nas medidas **em milímetros.**
Densi = **Número de células** que sobreviveram na região tratada (em ≅ 600 células totais).
h = Altura do tronco de cone analisado **em milímetros.**
B = Base maior do tronco de cone analisado **em milímetros.**
b = Base menor do tronco de cone analisado **em milímetros.**
V trn = Volume total do tronco de cone em **milímetros**^{3}.
TSac = Tempo tratamento-sacrifício **em horas.**

3.4. Estatística descritiva.

	Variável	N	Valor Médio (μ)	Desvio padrão (σ)	Mínimo	Máximo
1	**Massa (g)**	18	167.44	22.22	134.00	207.00
2	**Espessura Epiderme (mm)**	18	0.86	0.19	0.60	1.20
3	**Espessura do Músculo (mm)**	18	0.09	0.88	0.23	0.50
4	**Densidade (células)**	18	26.83	25.14	0.00	70.00
5	**Eficiência (%)**	18	0.96	0.04	0.88	1.00
6	**Penetração Total Trat. (mm)**	18	2.10	0.61	1.25	3.35
7	**h (mm)**	18	0.94	0.52	0.25	1.98
8	**B (mm)**	18	1.54	0.63	0.50	2.75
9	**b (mm)**	18	1.11	0.61	0.38	2.75
10	**V_{tronco} (mm^3)**	18	1.60	1.49	0.05	5.15

Tabela 6.2: Descrição dos dados obtidos. Foram excluídos da análise estatística os dados do animal **-4** devido *ocorrência de trombose nos vasos*, e o animal **-6** devido a problemas técnicos de inclusão *(corte oblíquo)*.

3.5. Comparação de 2 grupos.

Ao analisarmos uma variável com *distribuição normal*, a comparação entre as médias e as variâncias (ou desvio padrão) de 2 grupos, infere se que estes grupos foram extraídos de uma mesma população (*amostra homogênea* - representando que o fornecimento de oxigênio em ambiente hiperbárico não influi no tratamento PDT), ou se a HBO proporcionou uma diferença significativa com relação ao tratamento PDT (*amostra heterogênea*).

Utilizando o programa WinStat, foi possível gerarmos os resultados dos testes apresentados na **Tabela 6.3.** Através deste programa foi possível verificarmos primeiramente se as variáveis representativas pertencem a uma *distribuição normal*. Foi feita a comparação pelo teste "t de student", obtendo o resultado final.

	RESULTADOS	
Variável	**Tipo de Distribuição**	**"t"de student para G1 e G3.**
Epi (mm)	normal (P=0,3355)	-
Músc (mm)	normal (P=0,4476)	-
Densidade (células)	normal (P=0,5861)	**P=0,0527**
h (mm)	normal (P=0,9680)	**P=0,0002**
B (mm)	normal (P=0,9883)	**P=0,0453**
b (mm)	normal (P=0,9327)	**P=0,4996**
V_{tronco} (mm^3)	normal (P=0,7529)	**P=0,0076**

Tabela 6.3: Resultado da análise estatística utilizando o teste "t de student".

3.6. Descrição gráfica.

As **Figuras 6.10 e 6.11,** mostram a comparação quantitativa do tratamento PDT para as situações da **Tabela 6.1**, dentro e fora da câmara, com relação aos parâmetros que traduzem sistematicamente o tratamento realizado, ou seja **h, B, b** e V_{tronco} do tronco de cone, e a **Densidade** no interior deste.

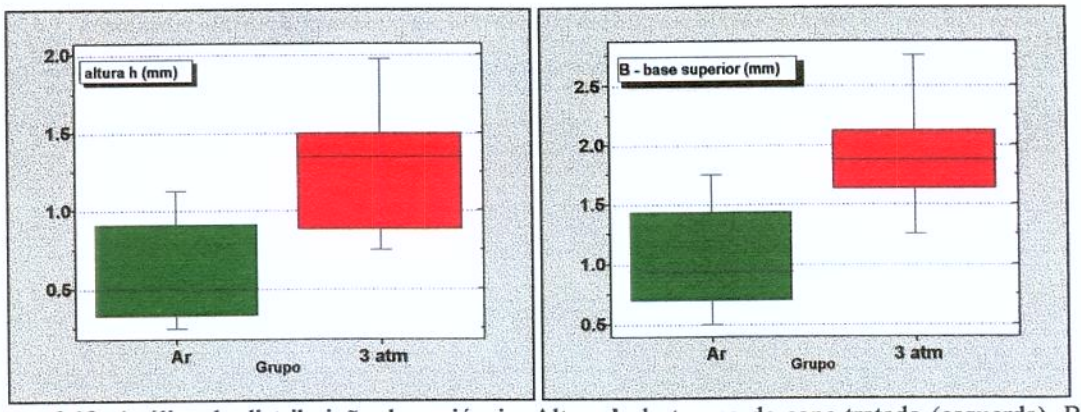


Figura 6.10: Análise da distribuição de variáveis: Altura **h** do tronco de cone tratado (esquerda), Base superior (direita).

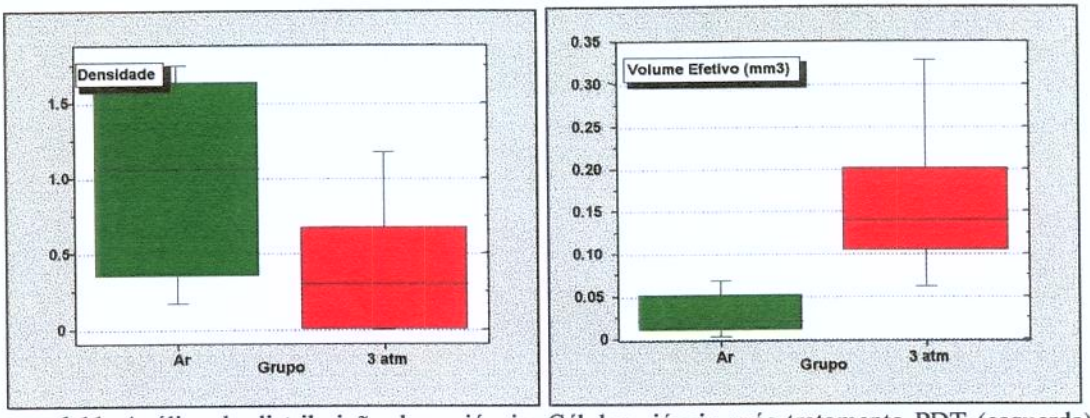


Figura 6.11: Análise da distribuição de variáveis: Células viáveis após tratamento PDT (esquerda), e valor efetivo do volume da área tratada (direita).

3.7. Análise discriminante.

Realizamos a *Análise Discriminante* com o objetivo de saber que parâmetros morfométricos "separam melhor os grupos" - em outras palavras, "que parâmetros expressam melhor a diferença entre os 2 grupos.

Uma função discriminante do espaço amostral, descreve os casos que lhe deram origem. Esta função pode estimar, ou até gerar amostras que contenham características dos casos que lhe deram origem. O *método Jackknife* consiste em retirarmos *um caso* do espaço amostral, recalcular a função discriminante baseada nos *n-1* casos restantes, e então reclassificar o caso retirado.

A **Figura 6.12** mostra o espaço amostral dos dados experimentais, através das variáveis que melhor descrevem o experimento.

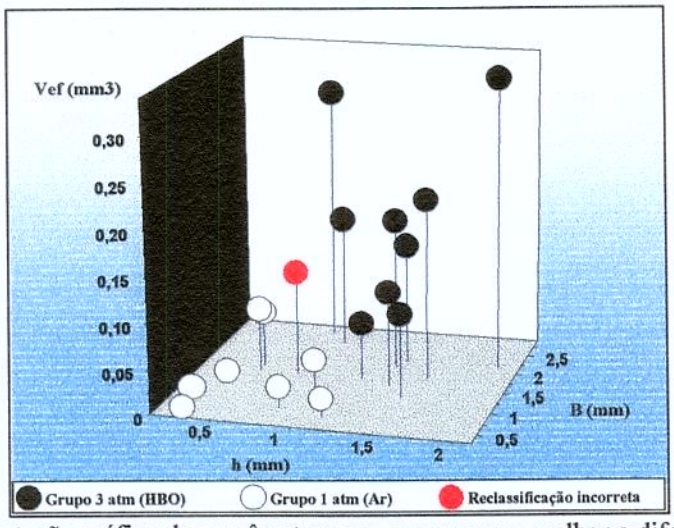


Figura 6.12: Representação gráfica dos parâmetros que expressaram melhor a diferença entre os grupos G1 e G3.

Como podemos observar na **Figura 6.12**, os animais tratados com HBO=3atm (bolas cheias) formam um grupo bem distinto quando comparado com os animais tratados em condições normais (1atm), esta distinção é devido ao *coeficiente da função discriminante padrão* dos parâmetros que melhor separam os grupos ("V_{Tronco},"; "B"; "h"). Dos *18 casos* analisados, somente o caso **16 (Tabela 6.1)** foi reclassificado como tratado em 1atm.

O **Quadro 6.1**, abaixo, sintetiza nossos resultados experimentais de acordo com o protocolo utilizado para os cinco grupos experimentais em questão.

Grupo	Tecido	Condição de Oxigenação	HpE	Laser	Dano
01	tumor	Condições normais: Ar (21% O_2), 1 atm	sim	sim	+
02	tumor	HBO: 100% O_2, 2 atm	sim	sim	++
03	tumor	HBO: 100% O_2, 3 atm	sim	sim	+++
04	tumor	HBO: 100% O_2, 3 atm	não	sim	não
05	normal	HBO: 100% O_2, 3 atm	não	sim	não

Quadro 6.1: Síntese dos resultados obtidos considerando os cinco grupos experimentais.

CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS

*"Tempos de crescimento implicam em dificuldades. Assemelham-se a um primeiro nascimento. Mas estas dificuldades surgem da profusão de seres que lutam por adquirir forma. Tudo está em movimento...(**I Ching**)."*

A Terapia Fotodinâmica é um procedimento complexo e sinônimo de extremo envolvimento inter-disciplinar. Para um entendimento do processo, muitos parâmetros como concentração, propriedades biológicas e químicas dos fotossensibilizadores, características da luz excitadora como: comprimento de onda, intensidade, e a necessidade da presença de oxigênio molecular devem ser consideradas.

Nossa proposta inicial foi de *testar a hipótese de que hiperoxigenação hiperbárica* (HBO) *aumentaria a eficiência da PDT*. Fomos capazes de mostrar que a PDT+HBO *pode reduzir para zero o número de células cancerosas remanescentes* da área sob a aplicação laser 24 horas após o tratamento no tumor de Walker 256. Mostramos também que o ambiente hiperbárico aumenta a "área" tratada pela PDT, isto foi avaliado pela penetração e o volume efetivo do tratamento, analisado em lâminas histológicas.

O presente trabalho contribuiu para os conhecimentos científicos sobre a Terapia Fotodinâmica do Câncer tanto teórica, como experimentalmente. Ao propormos, com bases na experiência anterior do nosso grupo de trabalho, que a PDT poderia ser mais eficiente em situações hiperbáricas, conseguimos desenvolver um tratamento teórico original que prevê, em condições especiais, uma *proporcionalidade entre dano celular e aporte de oxigênio* do sistema ***(Equação 4.8)***.

O conjunto de experimentos que levamos a cabo, graças a uma metodologia correta, certifica indiscutivelmente a eficácia da PDT em situação *hiperbárica*, quando comparada com a PDT *convencional*, mostrando que, qualitativamente, o modelo matemático desenvolvido é correto. Este resultado, por si só é de grande importância, pois a PDT, apesar de utilizada clinicamente, até mesmo nos E.U.A., não está completamente entendida sob o ponto de vista teórico.

Julgamos que, o volume de trabalho desenvolvido ao longo da elaboração desta Tese, os conhecimentos adquiridos, a proposta inicial e os resultados obtidos são suficientes para a pretensão do grau de doutor. Entretanto o assunto não esta esgotado, deixando propostas de novos trabalhos de pesquisas na mesma área, por exemplo, julgamos que medidas sistemáticas da função dano celular x PO_2 devem ser feitas para dar elementos a um refinamento da teoria aqui proposta. Ainda, como a PDT do Walker 256 foi muito pouco estudada (apenas uma referência além do presente trabalho), há grandes possibilidades para estudos com este tumor envolvendo *medidas de fluorescência*, *"Photobleaching"* do fotossensibilizador, ou a Terapia em metastases como recentemente sugerido pela Dra. Ester Nicola ***(comunicação privada).***

Este estudo teve também a oportunidade de mostrar pela primeira vez que o Walker 256 responde adequadamente *à terapia fotodinâmica com HpE excitada por um laser de HeNe*. A análise histopatológica do tecido tratado pela PDT nos possibilitou um contato aprofundado com uma espécie peculiar de morte celular, a *Apoptose*. Este tipo especial de morte celular tem alertado pesquisadores, nos últimos anos ***(Zaidi 1993)***, como uma importante expressão de morte celular. Isto foi constatado pelo grande interesse demonstrado pela comunidade científica internacional ***(Nicola & Colussi 1997 - SPIE).***

Acreditamos que nosso trabalho representa uma contribuição para esta nova técnica de tratamento de câncer, *sugerindo tratamentos clínicos em situação hiperbárica como processo inovador*. O fato da PDT poder ser utilizada de forma alternativa, ou em conjunto com terapias convensionais - radioterapias e/ou quimioterapias, sem contra-indicações, somente vão ao encontro do maior interessado, o paciente.

Com relação a implantação da técnica, acreditamos que, tomando-se os devidos cuidados como: idoneidade da droga, hiperssensibilização do paciente e afinidade com as células alvo, *a técnica é extremamente confiável.*

Mas uma coisa é certa...

"A prevenção do câncer é mais efetiva do que quaisquer tratamentos"

APÊNDICES

APÊNDICE A

CRITÉRIO DE DESCOBERTA DE NOVAS DROGAS

O sistema de descoberta de novas drogas é primeiramente desenvolvido utilizando animais de laboratório para determinar a farmacologia e metabolismo da química a ser testada, determinando seus benefícios e sua performance sob uma séries de investigações. O material é testado inicialmente em animais (sadios) de várias maneiras diferentes envolvendo *efeitos farmacológicos, distribuição da droga dentro do organismo, mecanismo de ação da droga e toxicologia*. É frequentemente tomado mais que 10 anos e despendido mais de 10 milhões de dólares para desenvolver uma nova droga ***(Baker 1979)***.

Os *principais passos de pesquisa e atividades* pelos quais os derivados de hematoporfirina (HpD, HpE, DHE etc...) foram submetidos para poder ser atualmente comercializado *(Photofrin etc...)* são apresentadas os itens abaixo:

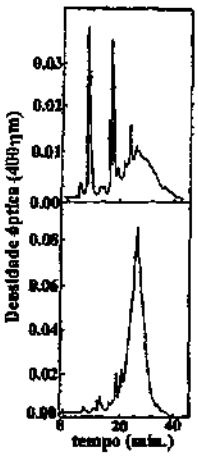
1. Confecção da química que demostra o efeito fotossensibilizante desejado ***(Dougherty 1974)***.
2. Produção de uma amostra de teste do material a ser utilizado em animais e estudos de pesquisa clínica ***(Pandey 1989)***.
3. Identificação da performance analítica produzida pela identificação da estrutura química, determinação da estabilidade, e purificação da química ***(Byrne 1990)***.
4. Condução farmacológica de teste de um sistema preliminar para utilizar em modelo de animais de laboratório ***(Dougherty 1975, Dougherty 1981)***.
5. Estudo do metabolismo para determinar absorção, distribuição e eliminação do material a ser testado ***(Bugelsky 1981, Bellnier 1989)***.
6. Estudo mais sofisticado em animais de laboratório avaliando mecanismo e ação da nova droga ***(Fingar 1987)***.
7. Testes pré-clínicos de toxidade em animais de laboratório e envio destes dados originais indicativos para o **FDA** em uma Investigação sem compromisso da Nova Droga (IND).
8. Seguido aprovação do IND e o protocolo químico pela FDA, a **Fase I** de ensaio clínico em voluntários humanos saudáveis é iniciada usando baixas doses e níveis avaliáveis de segurança e acessar níveis sanguíneos para a nova droga ***(Dougherty 1978)***.
9. Extensivos estudos são conduzidos em animais de laboratório para acessar efeitos de toxidade crônicas e subcrônicas tão bem como caracterizar o potencial para produzir mutagenicidade ***(Kvam 1990)***.
10. A **Fase II e III** de ensaio clínico humano são conduzidas em pacientes normal e doentes para determinar a eficácia da nova droga. Todos estes dados são avaliados e submetidos para o FDA em forma de um aplicação de uma nova droga (NDA). Seguindo a aprovação da agência regulatória, a nova droga é comercializada ***(Li 1990, Hayata 1992)***.

APÊNDICE B

COMPOSIÇÃO DO HpE *(Haematoporphyrin Esther)*

1. Dados cromatográficos.

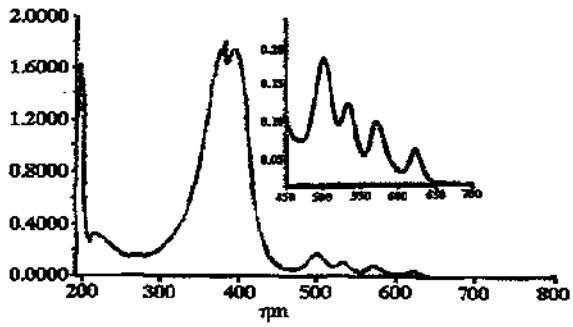
Separação por **HPLC** *(High Performance Liquid Chromatography)*- Coluna C_8 de fase reversa.



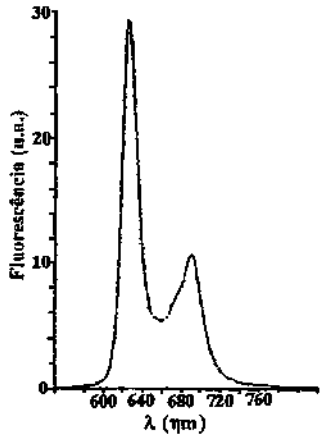
Componentes majoritários e tempo de retenção:
Hp *(Hematoporphyrin-35%)*, - 9 minutos
HVD *(HydroxyethylVinylDeuteroporphyrin-20%)* - 14,6 e 15,6 minutos
Pp *(Protoporphyrin-5%)* - 22,1 minutos
DHE *(Di-Hematoporphyrin Esther-40%)*. - 25-35 minutos

Análise de uma preparação de DHE:
O material se mostrou 99% puro.

2. Espectro de absorção.



3. Espectro de emissão fluorescente (λex=500ηm; HpE em metanol).



"Esta fluorescência é devida aos monômeros Hp, Hvd e Pp".

***Fax enviado pelo Dr. G. Truscott** (KEELE University-Chemistry Dep.).*

4. Técnica de preparação de um HpD *(Zezell 1987).*

A preparação de um derivado de hematoporfirina (HpD) consiste em várias etapas de manipulação, onde algumas devem ser feitas no escuro. Abaixo descrevemos o modo de preparo padrão, descrito por Dougherty, utilizado pelos fornecedores.

O *Método de preparação do HpD* consiste na dissolução por agitação de 1g de Hp.2HCl (Hematoporphyrin Dihydrocloride-Sigma Chemical Co.) em uma mistura de 19ml de ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH-Merck) e 1ml de ácido sulfúrico concentrado suprapur, P.A. (H_2SO_4-Merck) durante aproximadamente 20 minutos. Esta solução permanece em repouso 24h no escuro à temperatura de 20°C, a seguir é filtrada em papel de filtro Whatmann n°1, cerca de 30 minutos. Com a adição de cerca de 15 litros de solução aquosa (3-5)% de acetato de sódio, P.A. ($CH_3COONa.3H_2O$-Merck) à solução inicialmente filtrada , estabelecendo-se pH=6 para que haja precipitação máxima de sólido.

O material precipitado é recolhido mediante filtração por gravidade (aproximadamente 48 horas) em papel de filtrado Whatmann n°1 e extensivamente lavado com água bidestilada. Os papéis de filtro com o sólido são colocados em um dissecador com sílica gel, onde é feito vácuo (10^{-2} torr) por cerca de 1 hora. O sólido recolhido pela raspagem dos papéis de filtro é o HpA (0,45g) e deve ser guardado em frasco escuro à temperatura de -20°C, até que se queira preparar a solução injetável, chamada de HpD.

A *solução injetável* é obtida dissolvendo-se a proporção de 1g de HpA para 50ml de solução de hidróxido de sódio, P.A. (NaOH-Merck) 0,1N. A solução é agitada por cerca de 1 hora à temperatura de 20°C e neutralizada a pH=7,1 com a adição de solução de ácido clorídrico, P.A.(HCl-Merck) 0,1N e ajustada a um volume total de 200ml com solução de cloreto de sódio, P.A. (NaCl-Merck) 0,9%. O NaCl é adicionado para tornar a solução isotônica. A solução é esterilizada por filtração em membrana #20 mm (millipore Co). Esta solução é estável quando guardada no escuro, em freezer, à -20°C por cerca de (3-6) meses.

Texto extraído da Dissertação de Mestrado da Dra. Denize Zezell.

A dose letal (LD_{50}) para o HpD em ratos é 275mg/kg e aproximadamente metade para o DHE. A causa da morte é devido a toxicidade no fígado. A dose clínica foi estipulada em 7.5mg/kg para o HpD e 4mg/kg para DHE ***(Dougherty 1987).***

APÊNDICE C

LASER DE HeNe

1. Transições de dipolo elétrico.

A **Figura C.1** mostra as *transições de dipolo-elétrico* possíveis num sistema de 2 níveis de energia de um átomo na presença de um campo eletromagnético.

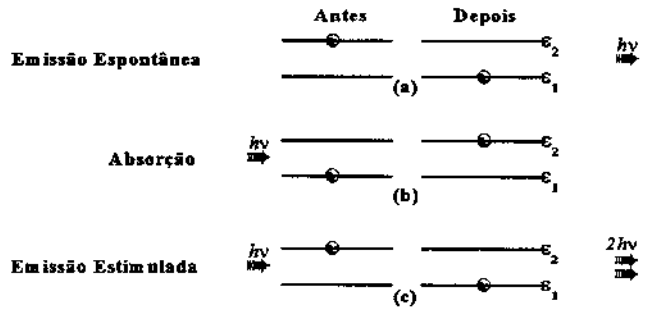


Figura C.1: Representação esquemática do processo de transição de dipolo-elétrico entre 2 níveis de um átomo na presença de um campo eletromagnético externo ***(Eisberg 1986).***

A *emissão espontânea e a absorção* já foram tratadas no texto. Na *emissão estimulada*, o sistema no estado (ε_2) decairá para o estado (ε_1) quando um feixe de densidade de energia espectral $\rho(\nu)$ interagir com o átomo. Deste processo resultam dois fótons simultâneos de energia idêntica, o incidente e o emitido. Neste caso, a probabilidade de muitas absorções ocorrerem num tempo ***dt*** aumenta significativamente, aumentando a probabilidade de emissão, tanto espontânea como estimulada.

O processo descrito acima pode ser extrapolado para um sistema de N átomos, onde N_1 e N_2 são os números médios de átomos nos respectivos estados. Considerando este sistema em equilíbrio térmico com o campo de radiação de densidade de energia $\rho(\nu)$, temos que a taxa total de absorção do sistema ($N_2\ R_{2\to1}$) será igual a taxa de emissão ($N_1\ R_{2\to1}$);

$$N_1[R_{1\to2}] = N_2[R_{2\to1}]$$

onde **R** é a taxa de transição por átomo, ou a probabilidade por átomo e por unidade de tempo de uma transição ocorrer.

Assim;

$$N_1[B_{12}\,\rho(\nu)] = N_2[A_{21} + B_{21}\,\rho(\nu)]$$

onde ***A e B são os coeficientes de Einstein*** que descrevem a probabilidade por unidade de tempo de emissão espontânea A_{21}, de emissão estimulada $B_{21}\rho(\nu)$.

Explicitando ρ*(ν)*, temos

$$\rho(\nu) = \frac{\frac{A_{21}}{B_{21}}}{\frac{N_1 B_{12}}{N_2 B_{21}} - 1}$$

De acordo com a *lei de distribuição de Boltzman*, a razão entre as população é dada por;

$\frac{N_1}{N_2} = e^{\frac{(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)}{kT}} = e^{\frac{h\nu}{kT}}$, resultando na expressão $\rho(\nu) = \frac{\frac{A_{21}}{B_{21}}}{\frac{B_{12}}{B_{21}} e^{\left(\frac{h\nu}{kT}\right)} - 1}$

Este sistema deve ser compatível com a radiação de um sistema térmico em equilíbrio, ou seja

$$\rho(\nu)_{Planck} = \frac{8\pi}{c^3} \frac{\nu^3}{e^{\frac{h\nu}{kT}} - 1},$$

Radiação do Corpo Negro ***(Planck - 1900)***

Portanto:

$$B_{12} = B_{21} \qquad A_{21} = \left(\frac{8\pi\nu^3}{c^3}\right) B_{21}$$

De onde tira-se que:

$$\frac{A_{21}}{B_{21}\rho(\nu)} = e^{\frac{h\nu}{kT}} - 1$$

Esta equação mostra que para átomos em equilíbrio térmico com a radiação, a emissão espontânea é muito mais provável do que a emissão estimulada se $h\nu >> kT$. Como essa condição se aplica a transição eletrônica tanto em átomos como em moléculas, a emissão estimulada pode ser desprezada em tais transições. A emissão estimulada pode, no entanto, ser significativa se $h\nu \cong kT$ e pode ser preponderante se $h\nu << kT$.

A razão entre a taxa de emissão e a taxa de absorção do sistema é dada por:

$$\frac{N_2 A_{21} + N_2 B_{21}\rho(\nu)}{N_1 B_{12}\rho(\nu)} = \left[1 + \frac{A_{21}}{B_{21}\rho(\nu)}\right] \frac{N_2}{N_1}$$

No equilíbrio térmico*, tem-se que* $N_2 < N_1$ *e a taxa de emissão é menor que a de absorção.*

O **LASER** (**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation), é um sistema no qual a população normal dos estados é invertida ($N_2>N_1$), portanto fora do equilibro, tendo como consequência uma radiação de frequência $\nu=(\varepsilon_2-\varepsilon_1)/h$ de intensidade amplificada pelo processo de interação. A perda de população, em estados elevados, é compensada por um *Bombeamento óptico* externo ao sistema. Na prática isto é obtido através da *Excitação*, por uma fonte estimuladora (elétrica ou óptica) de um *Meio* (sólido, líquido ou gás) capaz de produzir a ação laser, numa *Cavidade* (Interferômetro) que é constituída por um par de espelhos, alinhados paralelamente um ao outro. Desta forma, as ondas eletromagnéticas que se deslocam no sentido do espelho são refletidos de volta ao meio, resultando assim uma realimentação das ondas, como mostra **Figura** C.2.

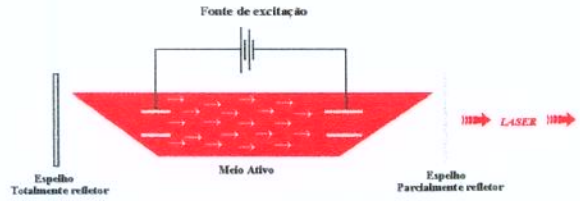


Figura C.2: Representação esquemática do sistema básico de um laser a gás.

O espelho frontal, não é totalmente refletor e deixa passar uma porcentagem de luz gerada no interior do meio. Como resultado, a saída é um feixe de radiação eletromagnética *intensa, coerente e monocromática.*

Fisicamente, a distribuição eletrônica total de uma configuração pode ser aproximada como uma superposição de cada um dos orbitais moleculares de um elétron que fazem a configuração. Para átomos de muitos elétrons e/ou moléculas complexas, *o momento angular orbital total* (**L**) é definido como a *soma vetorial* dos momenta angulares dos elétrons individualmente. O mesmo acontece para o *momento angular de spin eletrônico total* (**S**).

O *momento angular eletrônico total* (**J**) de um átomo e/ou molécula complexa é a *soma vetorial* dos momenta eletrônico orbital total (**L**) e momenta angular de spin (**S**):

$$\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$$

Em *notação espectroscópica tradicional*, a representação de um átomo polieletrônico ou de uma molécula complexa é dada por:

$$n \quad {}^{2S+1}L_J$$

onde n é o nível de energia do sistema e **2S+1** = **1**(Singleto), **2**(Dubleto), **3**(Tripleto)...

2. Mecanismo de bombeamento do laser de HeNe *(Yariv 1975).*

O principio de operação do laser de HeNe é mostrado esquematicamente na **Figura** C.3. Os átomos de **He** são excitados por uma descarga elétrica *(Bombeamento)* para uma variedade de estados. Na cascata de elétron que se segue para o estado fundamental, alguns são capturados nos estados metaestáveis 2^3S e 2^1S cujo tempo de vida são da ordem de 10^{-5}seg respectivamente aos níveis **2S** e **3S** do **Ne** podendo assim excitá-los. A excitação ocorre quando um átomo excitado de **He** colide com um átomo de **Ne** no estado fundamental e há troca de energia entre os átomos. A pequena diferença de energia ($\cong$400cm^{-1} no caso do nível **2S** é transformada em energia cinética dos átomos após a colisão.

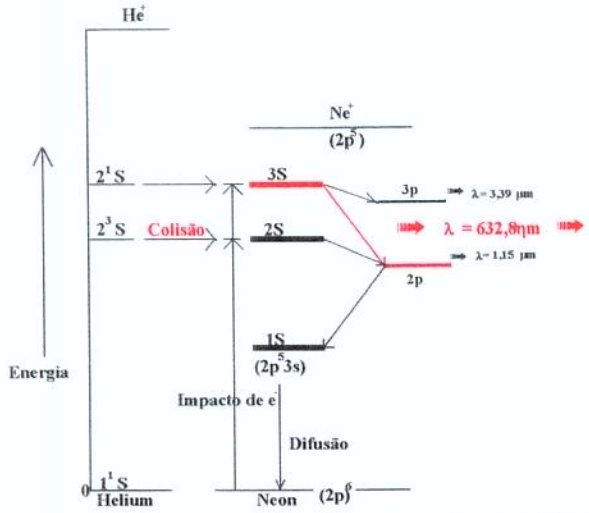


Figura C.3: Diagrama de níveis de energia para o laser de HeNe ***(Yariv 1975).***

Os principais mecanismos de bombeamento no sistema **HeNe** são:

- *Oscilações de λ=632,8ηm (Vermelho).* O nível superior é o nível **3S** do **Ne**, e o nível inferior é do grupo **2p**. Sabe-se que o tempo de vida do nível superior é 10 vezes maior que o tempo de vida do nível inferior, satisfazendo assim a condição de inversão de população.
- *Oscilação de λ=1,15μm (Infra-vermelho).* O nível superior **(2S)** é populado através de colisões com átomos de He no nível metaestável 2^3S.
- *Oscilações de λ=3,39μm (Infra-vermelho).* Este envolve transições entre **3S-3p.**

A *Coerência espacial* da luz traduz uma harmonia de fase da onda em todos os pontos. A *Coerência temporal* da luz implica na harmonia das fases da onda luminosa em um ponto do espaço durante um intervalo de tempo definido. A alta coerência da luz aumenta a probabilidade de transições eletrônicas com um sistema fotossensível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO (1986) M., S. Goldenberg. Fotoirradiação por laser e hematoporfirina no tratamento de tumores malignos. *Acta Cir. Bras. 1986.* 1(3):35-50.

ALAGOZ (1995) T., R.E. Buller, B. Anderson, K.L. Terrell, R.C. Squatrito, T.H. Niemann, D.J. Tatman, P. Jebson. Evaluation of hyperbaric oxygen as a chemosensitizer in the treatment of epithelial ovarian cancer in xenografts in mice. *Cancer 1995.* 75(9):2313-2322.

AULER (1942) H., G. Banzer. Untersuchungen uber die Rolle der porphyrine bei geschwulst kranken Menschen und Tieren. *Z. Krebsforsch 1942.* 53:65. Apud 01,21,22.

BAKER (1979) H.J., J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth (eds). The labotarory rat: Volume 1. American College of Laboratory animal medicine series. Academic Press, Inc. 1979.

BASERGA (1979) R.. Multiplication and division in mammalian cells. New York and Basel: Marcel Dekker Inc.

BELLNIER (1989) D.A., Y-K. Ho, R.K. Pandey, J.R. Missert, T.J. Dougherty. Distribution and elimination of Photofrin II in mice. *Photochem. Photobiol. 1989.* 50(2):221-228.

BUGELSKI (1981) P.J., C.W. Porter, T.J. Dougherty. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res. 1981.* 41:4606-4612.

BYRNE (1990) C.J., L.V. Marshallsay, A.D. Ward. The composition of Photofrin II. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology 1990.* 6:13-27.

BRAULT (1990) D.. Physical chemistry of porphyrins and theirs interations with membranes: The importance of pH. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology 1990.* 6:79-86.

CECKLER (1986) T.L., R.G. Bryant, D.P. Penney, S.L. Gibson, R. Hilf. ^{31}NMR Spectroscopy demonstrates decreased ATP levels *in vivo* as an early response to photodynamic therapy. *Biochem. Biophys. Res. Comm. 1986.* 140(1):273-279.

COHEN-TANNOUDJI (1977) C., B. Diu, F. Laloë. Quantum Mechanics. A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons. New York. 1977.

COLUSSI (1996) V.C., E.D.Nicola, J.Nicola. Fototerapia, Fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev. Ass. Med. Brasil. 1996.* 42(4):229-236.

COTRAN (1994) R.S., V. Kumar, S.L. Robbins. Pathologic Basis of Disease. W.B. Saunders, 5ª ed. International Edition.

DIAMONT (1972) I., S. Granelli, A.F. McDonagh, S. Nielsen, C.B. Wilson, R. Jaenicke. Photodynamic therapy of malignant tumors. *Lancet 1972.* 2:1175-1177.

DOUGHERTY (1974) T.J.. Activated dyes as anti-tumor agents. *J. Natl. Cancer Inst. 1974.* 52(4):1333-1336.

DOUGHERTY (1975) T.J., G. Grindey, R. Fiel, K. Weishaupt, D. Boyle. Photoradiation therapy II. Cure of animals tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst. 1975.* 55(1):115-120.

DOUGHERTY (1976) T.J., C.J. Gomer, K.R. Weishaupt. Energetics and efficiency of photoinactivation of murine tumor cells containing hematoporphyrin. *Cancer Res. 1976.* 36(7):2330-2333.

DOUGHERTY (1977) T., D.G. Boyle, K. Weishaupt, C. Gomer, D. Borcicky, J. Kaufman, G. Grindey. Phototherapy of human tumors. In *Research in Photobiology* (Edited by A. Castellani), pp. 435-466. Plenum Publishing Corp., New York.

DOUGHERTY (1978) T.J., J.E. Kaufman, A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res. 1978.* 38:2628-2635.

DOUGHERTY (1981) T.J.,R.E. Thoma, D.G. Boyle, K.R. Weshupt. Interstitial photoradiation therapy for primary solid tumors in pet cats and dogs. *Cancer Res. 1981.* 41:401-404.

DOUGHERTY (1987) T.J.. Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol. 1987.* 45(6):879-889.

DOUGHERTY (1993) T.J.. Photodynamic therapy: Yearly Review. *Photochem. Photobiol. 1993.* 58(6):895-900.

EARLE (1935) W.R.. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Cancer 1935.* 24:556-612.

EISBERG (1986) R., R. Resnick. Física Quântica: Átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas. Editora Campos. 4ª ed. 1986.

FIGGE (1948) F.H.J., G.S. Weiland, O.J. Manganiello. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948.* 68:640.

FINGAR (1987) V.H., B.W. Henderson. Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: A study of tumor and normal tissue response. *Photochem. Photobiol. 1987.* 46(5):837-841.

FOOTE (1968) C.S.. Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science. 1968.* 162(3857):963-970.

FOSTER (1992) T.H., S.L. Gibson, L. Gao, R. Hilf. Analysis of photochemical oxygen consumption effects in photodynamic therapy. In *Proc. SPIE Vol. 1645 "Optical Methods for tumor treatment and detection: Mechanisms and techniques in Photodynamic Therapy"* (Edited by T.J. Dougherty). pp 104-114. SPIE Press, Bellingham, W.A.

FREITAS (1991) I., G.F. Baronzio. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology 1991.* 11(1):3-30.

GUSMÃO (1992) R.J.. Diagnóstico de neoplasias malignas através da ação fotodinâmica do derivado de hematoporfirina (HpD): Desenvolvimento de um modelo experimental local. *Tese de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP 1992.*

GUYTON (1991) A.C.. Tratado de fisiologia médica. Guanabra-Koogan, 8ª ed. 1991.

HAUSMANN (1909) W.. Uber die giftige Wirkung des Haematoporphyrins auf Warmbluter bei Belichtung. Wien. klin. Wochenschr 1909. 22:1820-1821. Apud 14.

HAYATA (1992) Y., H. Kato, C. Konaka, K. Furukawa. Overview of clinical PDT. In Photodynamic therapy and biomedical lasers (Edited by P. Spinelli, M. Dal Fante, R. Marchesini), pp. 1-5. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

HECHT (1987) E.. Optics. Addison-Wesley Publishing Company: World student series ed., 2ª ed. 1987.

HENDERSON (1992) B.W., T.J. Dougherty. How does Photodynamic therapy work?. *Photochem. Photobiol. 1992.* 55(1):145-157.

HILF (1987) R., S.L. Gibson, D.P. Penney, T.L. Ceckler, R.G. Bryant. Early biochemical responses to photodynamic therapy monitored by NMR spectroscopy. *Photochem. Photobiol. 1987.* 46(5):809-817.

HILL (1992) R.P.. The basic science of oncology. Edited by I.F. Tannock, R.P. Hill. McGraw-Hill, Inc. Health Professions Division. 271. 1992.

JACKSON (1983) J.D.. Eletrodinâmica clássica. Guanabra-Dois-Koogan, 2ª ed. 1983.

JIRSA JR (1990) M., M. Sip, M. Jirsa. Influence of hyperbaric oxygenation on bilirubin and ditaurobilirubin auto-oxidation and porphyrin-sensitized photo-oxidation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology 1990.* 5:295-302.

JIRSA JR. (1991) M., P. Poucková, J. Dolezal, J. Pospisil, M. Jirsa. Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in tumor-bearing nude mice. *Eur. J. Cancer 1991.* 27(1):109.

KELLY (1976) J.F., M.E. Snell. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol. 1976.* 115:150-151.

KERR (1972) J.F.R., A.H. Wyllie, A.R. Currie. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br.J.Cancer 1972.* 26:239-257.

KVAM (1990) E., J. Moan. A comparison of three photosensitizers with respect to efficiency of cell inactivation, fluorescence quantum yield and DNA strand breaks. *Photochem. Photobiol. 1990.* 52(4):769-773.

LAUKKA (1994) M.A., K.K. Wang, J.A. Bonner. Apoptosis occurs in lymphoma cells but not in hepatoma cells following ionizing radiation and photodynamic therapy. *Digest. Diseas. Sciences.* 39(11):2467-2475.

LAUSTRIAT (1986) G.. "Molecular mechanisms of photosensitization". *Biochimie 1986.* 68:771-778.

LEDERLE (1989). Photofrin: porfimer sodium. In *training program.* Created and produced by Bioscience Communications Inc., Jacksonville.

LEE (1984) S., I.J. Forbes, W.H. Betts. Oxygen dependency of photoxicity with haematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol 1984.* 39:631-634.

LI (1990) J-H., Z-H. Guo, M-L. Jin F-Y. Zhao, W-M. Cai, M-L. Gao, M-Y. Shu, J. Zou. Photodynamic therapy in the treatment of malignant tumours: An analysis of 540 cases. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology 1990.* 6:149-155.

LIN (1991) C-W.. Photodynamic therapy of malignant tumors - Recent developments. *Cancer Cells 1991.* 3(11):437-444.

LIPSON (1960) R.L.. The photodynamic and fluorescent properties of a particular hematoporphyrin derivative and its use in tumor detection. *Master's Thesis 1960; University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota.*

LIPSON (1961) R.L., E.J. Baldes, A.M. Olsen. The use of a derivative of haematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl Cancer Inst. 1961* . 26:1-11.

LIPSON (1966) R.L., M.J. Gray, E.J. Baldes. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Ninth Internat. Cancer Congr., Tokyo, Japan. 1966 . pg 393 (abstract).*

MAXWELL (1891) J.C.. Treatise on eletricity and magnetism. 3ª ed. 1891, 2 vols., reprint by Dover, New York (1951).

MAZIERE (1990) **J.C.**, R. Santus, P. Morliere, J.P. Reyftmann, C. Candide, L. Mora, S. Salmon, C. Maziere, S. Gatt, L. Dubertret. Cellular uptake and photosensitizing proporties of anticancer porphyrins in cell membranes and low and high density lipoproteins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology 1990.* 6:61-68.

MEYER-BETZ (1913) F.. Untersuchungen uber die biologische (photodynamische) Wirkung de heatoporphyrins und andere derivate des blut und gallenfarbstoffs. *Deutsches Arch.klin. Med. 1913.* 112: 476-503. Apud 14.

MOAN (1985) J., S. Sommer. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK cells. *Cancer Res. 1985.* 45(4):1608-1610.

MOAN (1990) J.. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J. Photochem. Photobiol. B:Biol. 1990.* 6:343-344.

MOAN (1991) J., K. Berg. Photochemotherapy of cancer: Experimental research. *Photochem. Photobiol. 1992.* 55(6):931-948.

MUELLER-KLIESER (1983) W., P. Vaupel, R. Manz. Tumor oxygenation under normobaric and hyperbaric. *Br.J.Radiology 1983.* 56:559-564.

NICOLA (1997) J.H., ***COLUSSI*** V.C., E.M.D.Nicola, K. Metze. Enhancement of photodynamic therapy due to hyperbaric hyperoxia: An experimental study of Walker 256 tumors in rats. In *Optical Methods for tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy VI.* (Edited by T.J. Dougherty). SPIE Proceedings, San José, California USA.

PANDEY (1989) R.K., T.J. Dougherty. Synteses and photosensitizing activity of porphyrins joined with ester linkages. *Cancer Res. 1989.* 49:2042-2047.

PARRISH (1982) J.A.. Phototherapy of psoriasis and other skin diseases. In Regan JD, Parrish JA ed.. The Science of Photomedicine. NY, Plenum Press, 1982; 511-531.

PENG (1996) Q., J. Moan, J.M. Nesland. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastructural Pathology. 1996.* 20:109-129.

POLICARD (1924) A.. Etudes sur les aspects offerts par des tumour experimentales examinee a la lumiere de woods. CR Soc. Biol. 1924. 91:1423. Apud 21.

RAAB (1900) O.. Ueber die wirkung fluorescierender stoffe auf infusoria. *J. Biol. 1900.* 39:524.

RAMOS (1993) S.G.. Alterações miocárdicas em ratos com tumor de Walker: Dependência de fenômenos microvasculares. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo 1993.*

RETTORI (1995) O., A.N. Vieira-Matos, Q.S. Tahin. Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by Walker 256 tumor progress in rats. *Tumori. 1995.* 81: 370-377.

RETTORI (1996) O., A.N. Vieira-Matos, J.A.R. Gontijo. Reduced renal Sodium excretion in Walker-256 Tumor-Bearing rats. *Appla 1996.* 46:111-118.

RUSSO (1996) G.F. O uso da terapia fotodinâmica na oncologia. *Atualidades em Cancerologia 1996.* 6(2):6-10.

SCHWARTZ (1955) S., K. Absolon, H. Vermud. Some relationships of porphyrins, X-ray and tumors. *Bull Minnesota Univ School Med. 1955.* 27:7-23.

SIEBER (1993) F.. Phototherapy, photochemotherapy, and bone marrow Transplantation. *J. Hematol. 1993.* 2:43-62.

SIMMS (1967) H.S.. Longevity studies in rats.I. Relation between life span and age of of onset specific lesions. In "Pathology of laboratory rats and mice" (E. Cotchim and F.J.C. Roe, eds), pp. 733-747. Davis, Philadelphia, Pennsylvnia.

SIMPKINS (1991) H., J.M. Lehman, J.E. Mazurkiewicz, B.H. Davis. A morphological and phenotypic analysis of Walker 256 cells. *Cancer Res. 1991.* 51:1334-1338.

SOARES (1993) F.A., V.C. Terra. Thoracic lynph node metastasis and carcinomatous lymphangitis after inoculation of Walker 256 through the trachea. *Brazilian J. Med. Biol. Res. 1993.* 26:191-201.

STERENBORG (1996) H.J.C.M., J.J.C. Gemert. Photodynamic therapy with pulsed light sources: a theoretical analysis. *Phys. Med. Biol. 1996.* 41:835-849.

TAPPENIER (1903) H., A. Jesionek. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffe. *Muench. Med. Wochschr. 1903.* 1:2042-2044.

TROMBERG (1990) B.J., A. Orenstein, S. Kimel, S.J. Barker, J. Hyatt, J.S. Nelson, M.W. Berns. *In vivo* tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. 1990.* 52(2):375-385.

TURRO (1977) N.J..Molecular photochemistry. 4ª Edição. W.A. Benjamin, Inc. Massachusetts. 1977.

VAUPEL (1974) P., G. Thews. PO_2 distribution in tumour tissue of DS-Carcinoma. *Oncology 1974.* 30:475-484.

WALKER (1994) P.R., M. Sikorska. Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol. 1994.* 72:615-623.

WEISHAUPT (1976) K.R., C.J. Gomer, T.J. Dougherty. Identification of singlete oxygen as the citotoxic agent in cancer photoinativation of a murin tumor. *Cancer Res. 1976.* 36(7):2326-2329.

WILSON (1986) B.C., M.S. Patterson. The physics of photodynamics therapy. *Phys. Med. Biol.* 1986. 31(4):327-360.

YARIV (1975) A.. Quantum eletronics. 2ª ed. John Wiley & Sons 1975.

ZAIDI (1993) S.I.A., N.L. Oleinick, M.T. Zaim and H. Mukhtar. Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 Tumors in C3H mice: Eletron microscopic, histopathologic and biochemical evidence. *Photochem. Photobiol. 1993.* 58(6):771-776.

ZEZELL (1987) M.D.. Hematoporfirina e derivados: Propriedades ópticas e terapia foto-dinâmica do câncer. *Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Física "Gleb Wataghin"/UNICAMP 1987.*

ZEZELL (1991) M.D.. Processos para monitoração e otimização da terapia foto-dinâmica de tumores. *Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Física "Gleb Wataghin"/UNICAMP 1991.*

ZHOU (1989) C.. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology 1989.* 3:299-318.

"Descobrir a gota ocasional da verdade no meio de um grande oceano de confusão e mistificação requer vigilância, dedicação e coragem. Mas, se não praticarmos esse hábito rigoroso de pensar, não podemos ter a esperança de solucionar os problemas verdadeiramente sérios com que nos defrontamos, e nos arriscamos a nos tornar uma nação de poetas, num mundo de patetas, prontos para sermos passados para trás pelo primeiro charlatão que cruzar nosso caminho".

Carl Sagan